



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad de Málaga

Tesis doctoral

**Evaluación de proteínas séricas e isoformas de procesamiento alternativo del
ARN como biomarcadores no invasivos en Esclerosis Múltiple:
descubrimiento y validación**

Isabel Brichette Mieg

Diciembre, 2025

Directoras:

Prof. Dra. Laura Leyva Fernández

Prof. Dra. Begoña Oliver Martos

Tutor:

Prof. Dr. Enrique Viguera Mínguez



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Isabel Brichette Mieg

 <http://orcid.org/0000-0002-1269-0729>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña ISABEL BRICHETTE MIEG

Estudiante del programa de doctorado BIOLOGOGÍA CELULAR Y MOLECULAR de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS E ISOFORMAS DE PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DEL ARN COMO BIOMARCADORES NO INVASIVOS EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE: DESCUBRIMIENTO Y VALIDACIÓN

Realizada bajo la tutorización de PROF. DR. ENRIQUE VIGUERA MÍNGUEZ y dirección de PROF. DRA. LAURA LEYVA FERNÁNDEZ Y PROF. DRA. BEGOÑA OLIVER MARTOS (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 16 de DICIEMBRE de 2025

Fdo.: ISABEL BRICHETTE MIEG Doctorando/a	Fdo.: PROF. DR. ENRIQUE VIGUERA MÍNGUEZ Tutor/a





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Fdo.: PROF. DRA. LAURA LEYVA FERNÁNDEZ

PROF. DRA. BEGOÑA OLIVER MARTOS

Director/es de tesis





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Por el presente documento, las DIRECTORAS de tesis Prof. Dra. D^a LAURA LEYVA FERNÁNDEZ, Investigadora del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga y Prof. Dra. D^a BEGOÑA OLIVER MARTOS, Investigadora del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Fisiología, de la Universidad de Málaga; y el TUTOR Prof. Dr. ENRIQUE VIGUERA MÍNGUEZ, Investigador del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética, de la Universidad de Málaga

CERTIFICAN

Que Dña. ISABEL BRICHETTE MIEG ha obtenido y estudiado personalmente bajo su dirección y tutorización los datos clínicos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: “Evaluación de proteínas séricas e isoformas de procesamiento alternativo del ARN como biomarcadores no invasivos en Esclerosis Múltiple: descubrimiento y validación”, y consideran que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y que el artículo que avala esta Tesis Doctoral:

Brichette-Mieg Isabel, Alonso-Torres Ana, Aliaga-Gaspar Pablo, Rodríguez-Bada José-Luis, Reyes-Garrido Virginia, Urbaneja Patricia, Muñoz Carmen, Díaz Sánchez María, Martín-Montañez Elisa, Cabello-Porras María-del-Rosario, Oliver-Martos Begoña y Leyva Laura. Discovery and Early Validation of Serum Protein Signatures in untreated Multiple Sclerosis patients: Identification of Six Candidate Biomarkers for Diagnosis and Stratification. *Frontiers in Immunology*. 2025 Aug 21;16:1579045. doi: 10.3389/fimmu.2025.1579045. PMID: 40918143; PMCID: PMC12408279, no ha sido empleado previamente como respaldo para otras Tesis.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en

Málaga 16 de diciembre de 2025.



Fdo. Prof. Dra. Laura
Leyva Fernández
Directora

Fdo. Prof. Dra Begoña
Oliver Martos
Directora

Fdo. Prof. Dr. Enrique Viguera
Mínguez
Tutor

FINANCIACIÓN

La candidata Isabel Brichette Mieg ha disfrutado de un **contrato de investigación** PFIS (FI19-000139); Contrato Predoctoral de Formación en Investigación del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (2020-2024).

Además, ha participado como miembro del equipo de investigación o de trabajo de los siguientes proyectos de investigación:

1. PIP -0123 -2022. Medicina personalizada en enfermedades neurológicas mediante la aplicación de biomarcadores para la mejora del diagnóstico, pronóstico y tratamiento del paciente. Entidad financiadora: Consejería de Salud y Consumo, en la modalidad colaboración público-privada con Roche Farma S.A (2023-2026). IP: Begoña Oliver Martos y Pedro Serrano Castro.
2. PI22/00596. Genetic characterization and functional evaluation of the type I interferon response in patients with anti-NMDA receptor encephalitis. Entidad financiadora: ISCIII (2023-2025). IP: Begoña Oliver Martos y Nicolas Lundahl Ciano Petersen.
3. PI21/01668. Biomarcadores pronósticos de evolución clínica en pacientes con esclerosis múltiple remitente recurrente de diagnóstico reciente: volumetría de la médula espinal. Entidad financiadora: ISCIII (2022-2024). IP: Laura Leyva Fernández y Ana Alonso Torres.
4. CPC21132. Evaluation of soluble and membrane factors as non-invasive biomarkers in PP-MS: validation phase. Entidad financiadora: Asociación Española de Esclerosis Múltiple España y Red Española de Esclerosis Múltiple. (2021-2022). IP: Laura Leyva Fernández.
5. PI18/00551. Evaluation of soluble and membrane cytokine receptors as non-invasive Multiple Sclerosis biomarkers: Investigation and validation. Entidad financiadora: ISCIII (2019-2021). IP: Lara Leyva Fernández y Begoña Oliver Martos.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Durante el desarrollo de la tesis doctoral, la candidata Isabel Brichette Mieg ha participado en cuatro publicaciones científicas, ha presentado su trabajo en diversos congresos internacionales y locales, ha realizado dos estancias en el extranjero y ha solicitado dos patentes como resultado de este trabajo.

Publicaciones

1. **Brichette-Mieg I.**, Alonso-Torres A., Aliaga-Gaspar P., Rodríguez-Bada JL., Reyes-Garrido V., Urbaneja P., Muñoz C., Díaz Sánchez M., Martín-Montañez E., Cabello-Porras MdR., Oliver-Martos B., Leyva L. Discovery and Early Validation of Serum Protein Signatures in untreated Multiple Sclerosis patients: Identification of Six Candidate Biomarkers for Diagnosis and Stratification. *Frontiers in Immunology* 2025; 16:1579045. Published 2025 Aug 21. doi:10.3389/fimmu.2025.1579045. Se adjunta al final del documento.
2. Aliaga-Gaspar P., **Brichette-Mieg I.**, Fernández-Arjona MdM., Rodríguez-Bada JL., López-Moreno Y., Serrano-Castro P., Fernández O., Ciano-Petersen NL., Oliver-Martos B. Recombinant soluble type I interferon receptor exerts antiviral activity by inducing proteins related to autophagy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 181 - 117678, 21/11/2024. <https://doi.10.1016/j.biopha.2024.117678>.
3. Ciano-Petersen N., Aliaga-Gaspar P., Hurtado-Guerrero I., Reyes V., Rodríguez-Bada JL., Rodríguez-Traver E., **Brichette-Mieg I.**, Leyva L., Serrano-Castro P., Alonso-Torres A.; Oliver-Martos B. Natalizumab-immunogenicity evaluation in patients with infusion related events or disease exacerbations. *Frontiers in Immunology*. 14, 22/08/2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1242508>.
4. Aliaga-Gaspar P., Hurtado-Guerrero I., Ciano-Petersen NL; Urbaneja P., **Brichette-Mieg, I.**, Reyes V., Rodríguez-Bada JL., Alvarez-Lafuente R., Arroyo R., Quintana E., Ramió-Torrentà L., Alonso A., Leyva L., Fernández O., Oliver-Martos B. Soluble Receptor Isoform of IFN-Beta (sIFNAR2) in Multiple Sclerosis Patients and Their Association With the Clinical Response to IFN-Beta Treatment.

Presentaciones en Congresos

1. Differences in the expression of alternatively spliced RNA isoforms in the blood of patients with Multiple Sclerosis. 9th ECTRIMS-ECTRIMS Meeting, Milan, Italia. 11-13 octubre 2023. Presentación con póster.
2. Alternative spliced genes in peripheral blood mononuclear cells from Multiple Sclerosis patients. 30th Annual Meeting of the European Charcot Foundation. Baveno, Italia. 17-19 noviembre 2022. Presentación con póster.
3. Analysis of serum protein biomarkers in clinical forms of Multiple Sclerosis. 29th Annual Meeting of the European Charcot Foundation Baveno, Italia. 14-18 noviembre 2021. European Charcot Foundation. Presentación con póster
4. Soluble IFN- β receptor in multiple Sclerosis patients. Association with the clinical response to IFN- β treatment. 15th ISNI Congress 08-12 de noviembre 2021. Presentación con póster
5. Evaluación de los receptores de citoquinas solubles y de membrana como biomarcadores no invasivos en la Esclerosis Múltiple: descubrimiento y validación. XXIII Jornada de Biología Celular y Molecular, Universidad de Málaga. 10-11 junio 2021. Presentación oral.

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN

Con el objetivo de optar al doctorado con mención internacional, la candidata Isabel Brichette Mieg, realizó dos estancias de investigación en la Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Reino Unido, durante los veranos de 2022 y 2023, bajo la dirección de la Senior Lecturer Gloria López Castejón. Durante estas estancias llevó a cabo una investigación científica en el marco del proyecto titulado *“Determinación del nivel de activación de los componentes del inflamasoma NLRP3 para el estudio de su evaluación como biomarcadores no*

invasivos en Esclerosis Múltiple". Dichas estancias fueron financiadas mediante dos ayudas concedidas por el Plan Propio del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina (IBIMA. Plataforma BIONAND).

PATENTES

Los resultados de esta Tesis han dado lugar a la solicitud de 2 invenciones:

- Método *in vitro* para el diagnóstico y la identificación del estado clínico de la Esclerosis Múltiple (P202530753)
- Biomarcadores relacionados con la Esclerosis Múltiple (P202530754).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Cuando no sepas cómo seguir, para y piensa

Cuando no sepas qué hacer, lee

Cuando no sepas qué escribir, lee



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Es tan grande lo que siento que sólo lo puedo empequeñecer reduciéndolo a palabras, como el paisaje que queremos plasmar en una foto de móvil. Nunca se le hace justicia.

Quiero agradecer a Laura y a Begoña por haber apostado por mí. Nunca agradeceré lo suficiente que hayan permitido que un sueño se hiciese realidad, De Laura me quedo con su rigor en el trabajo, su constancia y con el no darse nunca por vencida. De Begoña con sus conocimientos, su sabia intuición y su siempre buen ánimo. De las dos, con su capacidad de trabajo. Intento a diario parecerme a ellas al hacer mi trabajo. Pero sobre todo les agradezco haberme dado la oportunidad de hacer un proyecto que tanto he disfrutado y amado.

A Pablo “el de todos” por haberse presentado el primer día mirándome de frente y haberme hecho sentir parte del laboratorio desde ese momento.

A Juanmi, mi primer amigo en el laboratorio. Nuestro dúo clarinete - violonchelo se quedó en mi carpeta de casa>partituras>imprimir esperando a organizar un momento y un lugar de ensayo. Y no pasa nada, nosotros disfrutamos planificándolo, fue bonito también.

A Isaac por haberme dado el relevo y recordarme los principios de la PCR. A Jesús por mis primeros pasos en el laboratorio y ayudarme a sacar tantas muestras del nitrógeno líquido y a Pepe, por ser tan buen compañero de todos y por su ayuda con los ELISAS, sus R^2 perfectas y por encontrar siempre todo. A Pablo “el nuestro”, por estar siempre tan dispuesto a ayudar y haberlo hecho de forma tan eficiente en cualquier tema bioinformático, o informático a secas, o biológico, o estadístico... de todo, vamos. A Estefanía por ser mi primer y continuo apoyo.

A Mar por ser la mejor compañera de grupo que puede existir. Por su incansable voluntad, su paz, y por cargar con el doble de trabajo para permitir que yo le dedicara todo el tiempo necesario a esta tesis.

A María y Sara que me han acompañado a mucho *people watching* y mucho *adimensional*. María, tengo la certeza que esta amistad va a ir más lejos que estos 4 años, y Sara, gracias a tí he aprendido que miedo... sólo a las alturas! Pero sobre todo me habéis enseñado que una sola puede llegar muy rápido, pero que, en compañía, se llega lejos.

A mis compañeras del café en la cocinita, Marina, Eva, Ceci, Wassima, Sheila, Gema, Lina, Paqui y su música, por hacer las mañanas tan amenas y conseguir que una trabaje y socialice a la vez. Dos en uno. Qué más se puede pedir! Pero de manera especial a las que son mis compañeras de despacho. Flores, que me acompañó desde el principio, mi primera compañera pre-doc, con la que he crecido, y mi paisaniña Ana, la niña más buena, con más paciencia y con el corazón más grande de todo el Civil. Un gusto teneros de compis.

Agradecimientos

A toda la gente que de forma afortunada han confluído en mi camino para que yo pudiera hacer esta tesis, especialmente a Rafa Uceda por empujarme hacia adelante y a mi amiga Ana Grande, que retomar la ciencia con ella me posicionó para conseguí este trabajo.

A Gloria en Manchester. Por el regalo de esas dos estancias tan enriquecedoras y tan disfrutadas. Aprendí muchas cosas en el campo profesional, y además aprendí a dedicarle un esfuerzo a todos los que vienen de visita a mi laboratorio. Es la manera que tengo de pagar la deuda que tengo con ella y su grupo.

A mis sobrinos, por darle un toque personal a esta tesis con sus ilustraciones.

A mis hijas. Y aquí sí que va a quedar simple la foto. Porque sois tan grandes que todo lo que diga queda pobre. Sofía, mi mejor amiga, mi confidente, qué momentos tan divertidos pasamos juntas. Ana, con la que más me identifico, el pilar de la familia y la que la va a mantener unida cuando yo ya no esté. Qué afortunada soy de tenerte. Marta... ay mi Martiña que todo lo llena. Eres mi mejor compañía, disfruto tanto tu conversación, me enseñas tanto. María, el ángel que se cayó del cielo por error, tú con su sexto sentido, que brillas sin hacer ruido. Eres el apoyo más sólido. Gracias a las cuatro por apoyarme siempre con palabra y con acciones. Vosotras sois y seréis siempre lo primero, así que gracias por permitirme crecer profesionalmente y hacerme sentir como “una madre que hace cosas importantes”.

Gracias a mi padre, porque siempre me dijo que lo que mejor hacía era estudiar. Cómo me conocías, mira dónde estoy. Y a mi madre. Porque hay que dejar lo mejor para el final. No hay nadie que crea más en mí, que haya hecho más por mí en todas las etapas de mi vida que ella y sin pedir jamás nada a cambio. La mejor maestra. Gracias por todo, mamá.

Termino agradeciendo a la vida por enseñarme a conocerme a mí misma. En esta etapa he descubierto que soy valiente y firme en mis decisiones, aunque haya estado sola en muchas ocasiones. Gracias a los errores, porque ahora con perspectiva los veo como un reflejo de las circunstancias que me llevaron a tomar esas decisiones, y me alegro de haberlos cometido porque me han servido de aprendizaje y de autoconocimiento.

La vida nos da lo que nosotros le damos primero. Nos da oportunidades cuando nosotros le damos oportunidad, nos da sonrisas cuando nosotras le sonreímos. A mi me ha dado amor. Nunca me acuerdo del nombre de aquella película en que una hermana reprocha a otra que es fácil para ella ser feliz porque todo el mundo la ha querido, y ella responde, yo no soy feliz por lo que me han querido, sino por lo que yo he querido.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice de contenido

1.	INTRODUCCIÓN	39
1.1.	Epidemiología y etiología.....	39
1.2.	Factores de riesgo	41
1.2.1.	Factores de riesgo genético	42
1.2.2.	Factores de riesgo ambiental	45
1.3.	Diagnóstico	48
1.3.1.	Análisis del líquido cefalorraquídeo	50
1.3.2.	Potenciales evocados visuales y Tomografía de coherencia óptica	52
1.4.	Clasificación clínica. Formas evolutivas	52
1.5.	Fisiopatología de la EM.....	54
1.6.	Biomarcadores.....	61
1.6.1.	Biomarcadores clásicos en LCR	62
1.6.2.	Otros biomarcadores líquidos emergentes.....	63
1.7.	Procesamiento alternativo o splicing alternativo del ARN mensajero	70
1.7.1.	Regulación del procesamiento alternativo	71
1.7.2.	Procesamiento alternativo en enfermedades neurodegenerativas	73
1.7.3.	Procesamiento alternativo en la Esclerosis Múltiple	74
1.7.4.	Biotipos	76
1.8.	Desarrollo de biomarcadores	77
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	81
2.1.	Hipótesis	81
2.2.	Objetivo general	81
2.2.1.	Objetivos específicos.....	82
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	85
3.1.	Diseño del estudio	85
3.1.1.	Fase exploratoria o de descubrimiento.....	86
3.1.2.	Fase de validación	86
3.2.	Selección de sujetos.....	86
3.3.	Procesamiento de las muestras.....	88
3.3.1.	Análisis de proteínas. Obtención de suero.....	88
3.3.2.	Análisis de transcritos. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	89
3.4.	OBJETIVO I. Análisis proteómico. Fase exploratoria.....	90
3.4.1.	Análisis proteómico en suero de pacientes con EM y controles sanos.....	90

3.4.2.	Análisis de redes y vías de señalización en el análisis proteómico	94
3.5.	OBJETIVO II. Fase de validación del análisis proteómico sérico. Enzimoimmunoensayos	95
3.5.1.	Validación por Enzimoimmunoensayos	95
3.6.	OBJETIVO III. Análisis transcriptómico. Fase exploratoria de la expresión génica de isoformas de procesamiento alternativo del ARN	99
3.6.1.	Descongelación de las PBMC. Extracción y cuantificación de ARN total	100
3.6.2.	Preparación y secuenciación de librerías de mRNA-seq	102
3.6.3.	Análisis de expresión génica diferencial.....	103
3.6.4.	Enriquecimiento funcional y análisis de vías de señalización	103
3.7.	OBJETIVO IV. Fase de validación del análisis transcriptómico por PCR a tiempo real (qPCR)	104
3.7.1.	Obtención de ADN complementario mediante retrotranscripción (RT-PCR)	104
3.7.2.	Selección de biomarcadores y diseño de cebadores.....	105
3.7.3.	Cuantificación relativa de la expresión génica de isoformas de procesamiento alternativo del ARN por PCR a tiempo real	106
3.7.4.	Cálculo de la expresión relativa.....	109
3.7.5.	Análisis estadístico	111
3.7.6.	Análisis de predicción topológica y señalización de isoformas de receptores sobreexpresadas en EM	112
4.	RESULTADOS	117
4.1.	OBJETIVO I. Caracterización cualitativa y cuantitativa del proteoma sérico mediante UHPLC-HRMS. Fase exploratoria	117
4.1.1.	Características demográficas y clínicas de los sujetos seleccionados	117
4.1.2.	Estudio proteómico. Fase exploratoria por cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución	118
4.1.3.	OBJETIVO I.a. Selección proteínas candidatas a biomarcadores que discriminen entre pacientes con las diferentes formas clínicas de EM y controles sanos.....	124
4.1.4.	OBJETIVO I.b. Identificación proteínas asociadas a la actividad de la enfermedad dentro de las formas clínicas EMRR, EMSP y EMPP	132
4.2.	OBJETIVO II. Validación por enzimoimmunoensayo de las proteínas con mayor poder discriminativo en el análisis proteómico.....	134
4.2.1.	Características demográficas y clínicas de los sujetos seleccionados.....	134
4.2.2.	Fase de validación del estudio proteómico. Enzimoimmunoanálisis	136
4.2.3.	Mapeo de proteínas diferencialmente abundantes a vías de Reactome	142
4.2.4.	Análisis de proteínas diferencialmente abundantes con otras variables clínicas	143
4.3.	OBJETIVO III. Análisis transcriptómico mediante RNA-seq en células mononucleares de sangre periférica. Fase exploratoria.....	145

4.3.1.	Características demográficas y clínicas de los sujetos seleccionados.....	145
4.3.2.	Diseño del estudio.....	146
4.3.3.	OBJETIVO III.a. Selección de isoformas transcriptómicas candidatas a biomarcadores diagnósticos	148
4.3.4.	OBJETIVO III.b. Identificación de isoformas asociadas a la actividad de la enfermedad.....	168
4.3.5.	OBJETIVO III.c. Análisis de expresión génica diferencial entre el grupo de pacientes con otras enfermedades neuroinflamatorias (OIND) y los pacientes con EM .	182
4.4.	OBJETIVO IV. Validación de las isoformas con mayor valor discriminativo en el análisis transcriptómico por PCR a tiempo real	186
4.4.1.	Características demográficas y clínicas de los sujetos seleccionados.....	186
4.4.2.	Selección de isoformas.....	188
4.4.3.	Optimización de las condiciones experimentales de la PCR a tiempo real.....	191
4.4.4.	Validación por PCR a tiempo real.....	197
4.4.5.	Evaluación de la capacidad diagnóstica mediante curvas ROC	206
4.4.6.	Capacidad de las isoformas seleccionadas para la estratificación de pacientes mediante curvas ROC	209
4.4.7.	Expresión diferencial de las isoformas en los pacientes con OIND	211
4.4.8.	Predicción topológica y señalización de isoformas de receptores sobreexpresadas en EM	215
5.	DISCUSIÓN.....	219
6.	CONCLUSIONES	245
7.	SUMMARY	251
8.	CONCLUSIONS	263
9.	ANEXO I	267
10.	ANEXO II	268
11.	ANEXO III	327
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	345

Índice de figuras

Figura 1. Distribución geográfica de la EM a nivel mundial.	40
Figura 2. Riesgo de EM en familiares.	43
Figura 3. Resonancia magnética nuclear convencional en EM.	50
Figura 4. Mecanismos de progresión de la EM..	54
Figura 5. Inmunopatogénesis de la EM..	56
Figura 6. Células B infectadas por VEB en la EM.	59
Figura 7. Conexión entre la infección por virus EBV y la disfunción inmune en la EM..	60
Figura 8. Patrones de procesamiento alternativo de pre-ARNm en genes eucariotas..	71
Figura 9 Desregulación del procesamiento alternativo en enfermedades neurodegenerativas.....	73
Figura 10. Flujo de trabajo del proceso de descubrimiento de biomarcadores.	85
Figura 11. Diagrama de flujo de la fase exploratoria del análisis proteómico	90
Figura 12.. Diagrama de flujo de la fase de validación del análisis proteómico.	95
Figura 13. Ejemplo del resultado de un ELISA	98
Figura 14. Diagrama de flujo de la fase exploratoria del análisis transcriptómico	99
Figura 15. Diagrama de flujo de la fase de validación del análisis transcriptómico. ...	104
Figura 16. Amplificación de las diluciones seriadas de ADN complementario de la isoforma NF- κ BIA-204.....	111
Figura 17. Diagrama de cajas con la abundancia de cada muestra, en escala logarítmica.....	119
Figura 18. Diagramas de Venn de las proteínas detectadas por cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución, comparando las distintas formas clínicas de EM con los controles sanos.	120
Figura 19. Abundancia diferencial de proteínas detectada por cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución, entre las distintas formas clínicas de EM.	122
Figura 20. Mapa de calor (Heatmap) del análisis jerárquico de las proteínas agrupadas por homologías.....	123

Figura 21. Volcano plots que representan la cuantificación de proteínas mediante análisis HPLC-HRMS	124
Figura 22. Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING, correspondiente a las proteínas con abundancia diferencial.	127
Figura 23. Análisis de enriquecimiento de vías Reactome a partir de DAP séricas con mayor abundancia en pacientes con EM en comparación con controles en la muestra de descubrimiento.....	129
Figura 24. Análisis de enriquecimiento de vías Reactome a partir de DAP séricas con menor abundancia en pacientes con EM en comparación con controles, en la muestra de descubrimiento.....	130
Figura 25. Volcano plots que representan la cuantificación de proteínas mediante análisis HPLC-HRMS.....	132
Figura 26. Distribución de los niveles de BST1, PRDX6 y APEH detectados por ELISA en el suero de pacientes con EM y sujetos control (HC).....	137
Figura 27. Representación de las curvas ROC de las proteínas BST1, PRDX6 y APEH..	137
Figura 28. Distribución de los niveles de proteínas detectados por ELISA en el suero de pacientes con EM y sujetos control (HC).....	140
Figura 29. Enriquecimiento de vías de Reactome de proteínas séricas diferencialmente expresadas en pacientes con EM en comparación con los controles, en la muestra de validación.....	143
Figura 30. Los niveles elevados de APEH y MST1 en suero se asocian con una mayor gravedad de la enfermedad en pacientes con EM.	145
Figura 31. Diagrama de flujo en la redacción de resultados de cada comparación realizada.....	147
Figura 32. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre todos los pacientes con EM y controles sanos.	149
Figura 33.Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING, correspondiente a las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con EM y HC	152
Figura 34.Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante rutas Reactome para las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas entre pacientes con EM y HC..	153

Figura 35. Diagrama de Venn de las variantes de procesamiento alternativo expresadas diferencialmente en las diferentes formas clínicas de EM con respecto a los controles.	154
Figura 36. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMRR y controles sanos.	156
Figura 37. Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING, correspondiente a las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con EMRR y HC	158
Figura 38. Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante rutas Reactome para las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas entre pacientes con EMRR y HC.	159
Figura 39. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMSP y controles sanos..	161
Figura 40. Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante rutas Reactome para las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas entre pacientes con EMSP y pacientes con HC.	164
Figura 41. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMPP y controles sanos.	166
Figura 42. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMRR y EMSP.....	169
Figura 43. Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING, correspondiente a las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con EMRR y con EMSP	171
Figura 44, Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante rutas Reactome para las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas entre pacientes con EMRR y pacientes con EMSP.....	172
Figura 45. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMRR y EMPP.....	174
Figura 46. Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING, correspondiente a las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con EMRR y con EMPP	176

Figura 47. Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante rutas Reactome para las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas entre pacientes con EMRR y pacientes con EMPP.....	177
Figura 48. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMSP y EMPP.....	179
Figura 49. Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante rutas Reactome para las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas entre pacientes con EMSP y pacientes con EMPP.	182
Figura 50. Mapas de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EM y OIND.....	183
Figura 51. Enriquecimiento de las interacciones proteína-proteína mediante STRING en la comparación pacientes OIND y pacientes con EM.....	186
Figura 52. Porcentaje de genes por ruta biológica en cada grupo funcional GO de las isoformas diferencialmente expresadas entre pacientes con EMRR y sujetos control, en clúster 2 tras el análisis con la herramienta ClueGo de Cytoscape.	189
Figura 53. Curvas de melting	192
Figura 54. Expresión diferencial de las isoformas codificantes de proteína asociadas a la vía de señalización del inflammasoma NLRP3 comparando las distintas formas clínicas de EM y grupos control..	199
Figura 55. Expresión diferencial de las isoformas no codificantes de proteína asociadas a la vía de señalización del inflammasoma NLRP3	201
Figura 56. Expresión diferencial de las citoquinas, quimiocinas, y moléculas de adhesión codificantes de proteína	203
Figura 57. Expresión diferencial de las citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión no codificantes de proteína, comparando las distintas formas clínicas de EM y grupos control.	204
Figura 58. Expresión diferencial de del resto de las isoformas de procesamiento alternativo, ...	206
Figura 59. Representación de las curvas ROC de las isoformas IL1R1-201, IL1RN-205, NFkBIZ-206, NFkBIA-206, NFkBIA-206 ICAM-206, y RNASEL-201.....	207
Figura 60. Representación de las curvas ROC de dos de las isoformas donde el estado predictivo era no padecer EM: CCL3-204 y PURA-201.....	208
Figura 61. Representación de la curva ROC del modelo combinado por las isoformas IL1R1-205, RNASEL-201 y PURA-201.....	209

Figura 62. Representación de las curvas ROC de las isoformas IL1R1-205, NFκB2-203, ELAC1-201 y PURA-201, en el análisis de conversión de EMRR a EMSP.....	210
Figura 63. Expresión diferencial de las isoformas en los pacientes con OIND versus HC.	212
Figura 64. Expresión diferencial de las isoformas en los pacientes con OIND versus pacientes con EMRR.....	213
Figura 65. Curvas ROC individuales de cinco biomarcadores para la discriminación entre pacientes con EMRR y OIND.....	214
Figura 66. Análisis topológico de las isoformas IL1R1-205, IL1RN-205 y PLAUR-214 mediante DeepTMHMM.	216

Índice de tablas

Tabla 1. Actualización de los criterios McDonald para el diagnóstico de EM (2024). ...	49
Tabla 2. Biotipos de las isoformas de procesamiento alternativo del ARN	76
Tabla 3. Proteínas determinadas por enzimoimmunoensayos tipo sándwich comerciales	95
Tabla 4. Rangos de detección de los kits ELISA.	97
Tabla 5. Características demográficas y clínicas de los pacientes con EM y sujetos control (HC) incluidos en la fase de descubrimiento del estudio proteómico.....	117
Tabla 6. Número de sujetos de cada grupo en los que se detectaban cada una de las proteínas con diferencias específicas entre las distintas formas clínicas de EM y los controles	121
Tabla 7. Proteínas desreguladas en el grupo de pacientes con EMRR frente a HC en el análisis proteómico	125
Tabla 8. Proteínas desreguladas en el grupo de pacientes con EMSP frente a HC en el análisis proteómico.	125
Tabla 9. Proteínas desreguladas en el grupo de pacientes con EMPP frente a HC en el análisis proteómico.	126
Tabla 10. Vías Reactome, ordenadas por valor de FDR, de las proteínas diferencialmente representadas en el análisis proteómico del suero de pacientes con EM, comparado con controles sanos	128
Tabla 11. Asignación a vías Reactome de proteínas diferencialmente abundantes en pacientes con diferentes formas clínicas de EM en comparación con controles	131
Tabla 12. Proteínas con abundancia diferencial en el grupo de pacientes con EMRR frente a EMPP en el análisis proteómico exploratorio.....	133
Tabla 13. Proteínas con abundancia diferencial en el grupo de pacientes con EMPP frente a EMSP en el análisis proteómico exploratorio	133
Tabla 14. Asignación a vías Reactome de proteínas diferencialmente abundantes entre pacientes con diferentes formas clínicas de EM entre sí	134
Tabla 15. Características demográficas y clínicas de los pacientes con Esclerosis Múltiple (EM) y sujetos control (HC) incluidos en la fase de validación del estudio proteómico	135

Tabla 16. Niveles de suero de las 6 proteínas desreguladas en la muestra de validación al estratificar a los pacientes según su forma clínica	138
Tabla 17. Resumen de los análisis de regresión lineal que evalúan la asociación entre los niveles de proteínas séricas y las medidas de discapacidad/gravedad de la enfermedad en los pacientes con EM de la muestra de validación.....	144
Tabla 18. Características demográficas y clínicas de la población de estudio en el análisis transcriptómico.....	146
Tabla 19. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EM (agrupando todas las formas clínicas) y controles sanos.....	149
Tabla 20. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMRR y controles sanos.....	157
Tabla 21. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMSP y controles sanos.....	162
Tabla 22. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMPP y controles sanos.....	167
Tabla 23. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMRR y EMSP	170
Tabla 24. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMRR y EMPP.	175
Tabla 25. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMSP y EMPP	180
Tabla 26. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con OIND versus pacientes con EM.	184
Tabla 27. Características demográficas y clínicas de los pacientes con Esclerosis Múltiple (EM) y sujetos control (HC) incluidos en la fase de validación del estudio transcriptómico	187

Tabla 28. Rutas y genes asociados de los grupos GO 2 y 6 del clúster 2 en la comparación EMRR vs controles, obtenidos con ClueGO	189
Tabla 29. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de las 38 isoformas de procesamiento alternativo en la validación mediante qPCR, y de los dos genes constitutivos GAPDH y UBE2D2	193
Tabla 30. Cambios en el nivel de significación estadística de la expresión diferencial obtenida por qPCR, comparando los métodos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y E de Pfaffl.	196
Tabla 31. Expresión diferencial de las isoformas de procesamiento alternativo pertenecientes a la vía de señalización del inflammasoma y codificantes de proteína entre las formas clínicas EMRR, EMSP, EMPP y los sujetos sanos (HC).	198
Tabla 32. Expresión diferencial de las isoformas de procesamiento alternativo pertenecientes a la vía de señalización del inflammasoma y no codificantes de proteína. entre las formas clínicas EMRR, EMSP, EMPP y los sujetos sanos (HC).	200
Tabla 33. Expresión diferencial de las isoformas de procesamiento alternativo pertenecientes a las citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, codificantes de proteína, entre las formas clínicas EMRR, EMSP, EMPP y los sujetos sanos (HC).	202
Tabla 34. Expresión diferencial de las isoformas de procesamiento alternativo pertenecientes a las citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, no codificantes de proteína, entre las formas clínicas EMRR, EMSP, EMPP y los sujetos sanos (HC). .	204
Tabla 35. Expresión diferencial del resto de las isoformas entre las formas clínicas EMRR, EMSP, EMPP y los sujetos sanos (HC).	205
Tabla 36. Área bajo la curva (AUC) asociada del análisis ROC cuando el estado predictivo se definió como padecer EM.....	207
Tabla 37. Área bajo la curva (AUC) asociada del análisis ROC cuando el estado predictivo se definió como NO padecer EM.....	208
Tabla 38. Rendimiento diagnóstico del modelo combinado del análisis ROC con los tres biomarcadores seleccionados.	209
Tabla 39. Area bajo la curva individual para cuatro isoformas en la comparación entre pacientes con EMRR y EMSP.	210
Tabla 40 . Area bajo la curva individual para cinco isoformas en la comparación entre pacientes con EMRR y OIND.....	214

Índice de tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1. Concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar en la determinación de las proteínas.....	267
Tabla suplementaria 2. Rutas Reactome de la comparación EM vs. HC. Clúster 1.	268
Tabla suplementaria 3. Rutas Reactome de la comparación EM vs..HC. Clúster 2.....	271
Tabla suplementaria 4. Rutas Reactome de la comparación EM vs.HC. Clúster 3.....	274
Tabla suplementaria 5. Rutas Reactome de la comparación EM vs.HC. Clúster 4.....	275
Tabla suplementaria 6. Rutas Reactome de la comparación EM vs.HC. Clúster 5.....	276
Tabla suplementaria 7. Rutas Reactome de la comparación EM vs.HC. Clúster 6.....	277
Tabla suplementaria 8. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.HC. Clúster 1. .	278
Tabla suplementaria 9. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.HC. Clúster 2.	280
Tabla suplementaria 10. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.HC. Clúster 3.	282
Tabla suplementaria 11. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.HC. Clúster 4..	289
Tabla suplementaria 12. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.HC. Clúster 5.	290
Tabla suplementaria 13. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.HC. Clúster 6.	290
Tabla suplementaria 14. Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.HC. Clúster 1	291
Tabla suplementaria 15. Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.HC. Clúster 2.	295
Tabla suplementaria 16. Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.HC. Clúster 3.	298
Tabla suplementaria 17. Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.HC. Clúster 4.	300
Tabla suplementaria 18. Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.HC. Clúster 5.	301
Tabla suplementaria 19. Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.HC. Clúster 6.	303
Tabla suplementaria 20. Rutas Reactome de la comparación EMPP vs.HC.	304
Tabla suplementaria 21. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.EMSP. Clúster 1.	305
Tabla suplementaria 22. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.EMSP. Clúster 2....	306

Tabla suplementaria 23. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.EMSP. Clúster 3.	307
Tabla suplementaria 24. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.EMSP. Clúster 4.	307
Tabla suplementaria 25. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.EMSP. Clúster 5. .	308
Tabla suplementaria 26. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.EMSP. Clúster 6..	308
Tabla suplementaria 27. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.EMPP. Clúster 1.	309
Tabla suplementaria 28. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.EMPP. Clúster2.	310
Tabla suplementaria 29. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.EMPP. Clúster 3.	311
Tabla suplementaria 30. Rutas Reactome de la comparación EMRR vs.EMPP. Clúster 4.	311
Tabla suplementaria 31. Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.EMPP. Clúster 1.	312
Tabla suplementaria 32. Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.EMPP. Clúster 2. .	315
Tabla suplementaria 33, Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.EMPP. Clúster 3.	317
Tabla suplementaria 34. Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.EMPP. Clúster 4..	319
Tabla suplementaria 35. Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.EMPP. Clúster 5.	322
Tabla suplementaria 36. Rutas Reactome de la comparación EMSP vs.EMPP. Clúster 6.	324
Tabla suplementaria 37. Rutas Reactome de la comparación OIND vs.EM.....	326
Tabla suplementaria 38. Cebadores diseñados y probados experimentalmente mediante qPCR	327
Tabla suplementaria 39. Cebadores de reserva.....	330

Índice de figuras suplementarias

Figura suplementaria 1. Representación gráfica de la localización de los 38 pares de cebadores diseñados para qPCR	331

Listado de abreviaturas

aa	Aminoácido
ACN	Acetonitrilo
ACTN1	Actinina 1 alfa
ADNc	ADN complementario
AF	Ácido fórmico
APEH	N-acilaminoacil-péptido hidrolasa
AQP-4	Acuaporina-4
AR	Ratio de abundancia
AUC	Área bajo la curva
BCR	Receptor de células B
BHE	Barrera hematoencefálica
BOC	Bandas oligoclonales
BST1	Antígeno de células estromales de médula ósea 1
BTK	Tirosin quinasa de Bruton
CCL	Ligando de quimiocina con motivo CC
CCL3L3	Ligando de quimiocina con motivo CC, similar a CCL3, número 3
CDS ND	Secuencia codificante no definida
CFHR2	Proteína 2 relacionada con el factor H del complemento
CFHR5	Proteína 5 relacionada con el factor H del complemento
CHI3L1/YKL-40	Quitinasa tipo 3
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CNAG	Centro Nacional de Análisis Genómico
CP	Codificador de proteína
CSF1R	Receptor del factor estimulador de colonias 1
Ct	Umbral de ciclo
CV	Coeficientes de variación
CXCL	Ligando de quimiocina con motivo CXC
DAP	Proteínas con abundancia diferencial
DIS	Diseminación en el espacio
DIT	Diseminación en el tiempo
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
E	Eficiencia de amplificación
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
EBNA1	Antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr
EDSS	Escala Ampliada del Estado de Discapacidad
EDTA	Ácido etilenodiaminatetraacético
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ELAC1	Ribonucleasa Z 1
ELANE	Elastasa expresada en neutrófilos
ELISA	Enzimoinmunoanálisis
EM	Esclerosis múltiple
EMCD	Esclerosis Múltiple clínicamente definida
EMPP	Esclerosis Múltiple primaria-progresiva
EMRR	Esclerosis Múltiple remitente-recurrente
EMSP	Esclerosis Múltiple secundariamente progresiva

FC	Fold change
FCGR3A	Receptor III-A de la región Fc de baja afinidad de la inmunoglobulina gamma
FDR	Tasa de falsos positivos
FOXP3	Factor de transcripción de la familia Forkhead, miembro P3
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GlialCAM	Proteína CAM de las células gliales
GM-CSF	Factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos
GSDM	Gasdermina
HC	Control sano
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HRUM	Hospital Regional Universitario de Málaga
IC	Intervalo de confianza
IFN	Interferón
IFNAR2	Subunidad 2 del receptor de interferones tipo I
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IL1R1	Receptor tipo 1 de la IL1
IL1RN	Antagonista del receptor de la IL1
ILR	Receptor de Interleucina
K-W	Kruskal-wallis
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MBP	Proteína básica de mielina
miARN	MicroARN
MMLV	Virus de la leucemia murina de Moloney
MOG	Glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos
MOGAD	Encefalomielitis asociada a anticuerpos contra MOG
MSSS	Escala de gravedad de la EM
MST1	Proteína estimuladora de macrófagos
NFATC1	Factor nuclear 1 de las células T
NfL	Cadena ligera de los neurofilamentos
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa en células B activadas
NFκBIA	Inhibidor A de NFκB
NFκBIZ	Inhibidor Z de NFκB
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NLR	Receptor que contiene un dominio de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina
NLRP3	Miembro 3 de la familia de receptores NLR que contienen un dominio pirina
NMD	Degradación mediada por codones sin sentido
NMOSD	Trastorno del espectro de neuromielitis óptica
NP	No codificador de proteína
nt	Nucleótidos
OIND	Otras enfermedades neurológicas inflamatorias
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCSK9	Proproteína convertasa subtilisina/kexina humana tipo 9

PEV	Potenciales evocados visuales
PGAM1	Fosfoglicerato mutasa 1
PLAUR	Receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa
PRDX6	Peroxirredoxina 6
PURA	Proteína A de unión a elementos ricos en purinas
qPCR	PCR a tiempo real
RI	Retención de intrón
RMN	Resonancia magnética
RNASEL	Ribonucleasa L
RNP	Ribonucleoproteína
ROC	Receiver operating characteristic
ROMS	Esclerosis Múltiple de inicio en brotes
RPL15	Proteína ribosómica L15
S100A6	Proteína de unión al calcio S100 A6
SBF	Suero bovino fetal
SCA	Síndrome clínico aislado
SCAI	Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación
SE	Exón saltado
sFCGR3A	FCGR3A soluble
sGFAP	Proteína ácida fibrilar glial sérica
sILR	Receptor soluble de Interleucina
SNC	Sistema nervioso central
sNfL	Neurofilamentos séricos
SRA	Síndrome radiológico aislado
SSPA	Sistema Sanitario Público de Andalucía
sTNF-R	Receptor soluble del Factor de Necrosis Tumoral
TA	Temperatura ambiente
TCO	Tomografía de coherencia óptica
TEC	Pendiente de confirmación experimental
Th	Temperatura de hibridación
TLR	Receptor tipo Toll
Tm	Temperatura de fusión
TME	Tratamientos modificadores de la enfermedad
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFRSF	Superfamilia del receptor de TNF
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis asociada TNF
TRAILR	Receptor de TRAIL
UBE2D2	Enzima conjugadora de la ubiquitina E2 D2
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento
UTR	Región no traducida
VE	Vesículas extracelulares
VEB	Virus de Epstein-Barr
VED	Variantes expresadas diferencialmente



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica autoinmune del sistema nervioso central (SNC) donde la inflamación, desmielinización y pérdida axonal ocurren desde los primeros estadios de la enfermedad. Cada uno de estos procesos contribuye en distinto grado al fenotipo del paciente con EM, lo que provoca que la enfermedad sea altamente heterogénea (Vidal-Jordana & Montalban, 2017). Las manifestaciones clínicas de la EM son muy variables e incluyen síntomas sensoriales, motores, visuales y cognitivos, sin que ninguno de ellos sea específico de la enfermedad (Compston & Coles, 2008).

Aunque en los últimos años el desarrollo de tratamientos ha experimentado un avance muy significativo, la EM sigue siendo una de las causas más frecuentes de discapacidad neurológica en adultos jóvenes (Segal, 2019).

1.1. Epidemiología y etiología

El inicio de la EM generalmente ocurre entre la segunda y la cuarta década de la vida, y afecta entre dos y tres veces más a las mujeres que a los hombres (Ysrraelit & Correale, 2018).

En la tercera edición del Atlas Mundial de la EM (Walton et al., 2020) se presentaron datos actualizados sobre la prevalencia e incidencia de esta enfermedad a nivel global. Se estima que 2,8 millones de personas viven actualmente con EM en todo el mundo, lo que equivale a una prevalencia de 36 casos por cada 100.000 habitantes. Esta cifra representa un aumento respecto a la estimación previa de 2,3 millones de personas registrada en 2013.

Diversos factores podrían haber contribuido a este incremento, entre ellos la mejora en los métodos de registro, el perfeccionamiento en el diagnóstico, el crecimiento de la población mundial y el aumento en la esperanza de vida de las personas con EM, gracias a los avances en los tratamientos y en la atención médica (Walton et al., 2020).

Aunque la prevalencia está aumentando en todas las regiones del mundo, todavía hay brechas entre países. América del Norte y Europa tienen la prevalencia más alta: con más de 200 casos y 142 casos por 100.000 habitantes, respectivamente; mientras que,

en África, sudeste de Asia y los países del Pacífico occidental, la prevalencia es de 8,7, 8,6 y 4,8 casos por cada 100.000 habitantes, respectivamente (Walton et al., 2020).

Varios estudios han demostrado que la prevalencia de la EM está relacionada con la latitud geográfica (Simpson et al., 2019). En general, las personas que viven en regiones más cercanas al ecuador presentan un menor riesgo de desarrollar EM, mientras que aquellas que viven en latitudes más altas, próximas a los polos, tienen un riesgo mayor, como se puede visualizar en el siguiente mapa (Figura 1). Una de las hipótesis más aceptadas para explicar este patrón sugiere que la menor exposición a la luz solar en latitudes elevadas conlleva niveles reducidos de vitamina D, un factor que podría influir en el riesgo de desarrollar la EM.

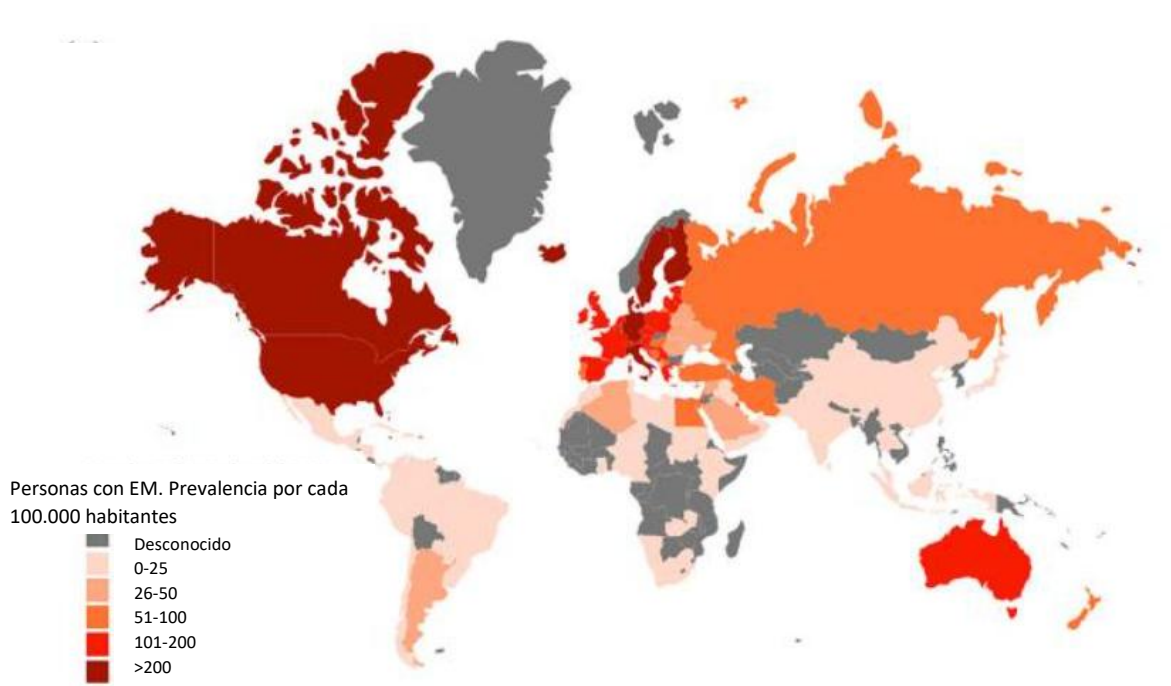


Figura 1. Distribución geográfica de la EM a nivel mundial. Imagen modificada de (Walton et al., 2020).

En las últimas décadas, se ha observado un aumento en la prevalencia de la EM en España; sin embargo, en muchos estudios, la confirmación de casos parece haber sido incompleta. Asimismo, la incidencia ha experimentado un incremento, aunque este podría atribuirse a una detección más exhaustiva de nuevos casos en los últimos años (García López et al., 2022).

La EM se presenta de manera más prevalente en mujeres que en hombres de manera universal. Esta disparidad ha impulsado estudios sobre las diferencias en el sistema inmunológico y nervioso entre ambos sexos, lo cual podría deberse a los efectos de las hormonas gonadales y a las diferencias genéticas (Harbo et al., 2013).

Varios artículos y revisiones se han centrado en cómo las hormonas sexuales, incluyendo los estrógenos y la testosterona, influyen en la susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes en las mujeres, aunque actualmente las dianas celulares y moleculares de estas hormonas todavía se desconocen (Barbuti et al., 2025; IN et al., 2025; Ortona et al., 2016). También se han estudiado los factores que confieren protección en los varones. Usando el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo animal ampliamente utilizado para el estudio de la EM, se ha identificado una vía de señalización inducida por testosterona mediada por la expresión de IL33 en mastocitos, que atenúa la respuesta inmune patogénica en machos (Russi et al., 2018).

Otros autores intentaron determinar si las diferencias en los cromosomas sexuales podían explicar las disparidades de género en la susceptibilidad a desarrollar EM en el modelo de EAE. Tras estudiar la metilación del gen *Forkhead box p3 (FOXP3)* del cromosoma X en linfocitos T, sugirieron que estas diferencias de autoinmunidad entre hombres y mujeres podía deberse a la impronta materna de los genes del cromosoma X *versus* la paterna. Observaron también que la expresión diferencial del gen *Toll-like receptor 7 (TLR7)* del cromosoma X en neuronas corticales de ratones con EAE podía contribuir a las diferencias sexuales que se observan en la neurodegeneración (Voskuhl et al., 2018).

1.2. Factores de riesgo

A pesar de que la incidencia y la prevalencia son cada vez mayores, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, la causa subyacente sigue siendo incierta. Se reconoce que esta enfermedad tiene un origen multifactorial, donde una compleja interacción entre factores genéticos, principalmente asociados al complejo mayor de histocompatibilidad, y factores ambientales, determinan el riesgo de que un individuo desarrolle la enfermedad (Oh et al., 2018).

1.2.1. Factores de riesgo genético

El conocimiento actual sobre los factores de riesgo genéticos implicados en EM proviene fundamentalmente de tres enfoques complementarios: estudios étnicos, estudios familiares y estudios de asociación genética.

Estudios étnicos

Varios estudios han evidenciado diferencias en la susceptibilidad a la EM entre distintas razas y etnias. Un estudio sobre la prevalencia de la EM en la comunidad gitana en Málaga reveló que ésta era significativamente menor en comparación con la población caucásica local, aunque superior a la registrada en la población gitana de Europa Central (Fernández et al., 2008). Asimismo, investigaciones étnicas han identificado poblaciones aparentemente más resistentes a la EM, como los lapones, maoríes de Nueva Zelanda, indios de Norteamérica, huteritas de Saskatchewan en Canadá o gitanos húngaros (Fernández et al., 2011). En otros estudios poblacionales realizados en el sur de California, se ha observado una prevalencia significativamente mayor de EM en las poblaciones de origen caucásico y afroamericano en comparación con las poblaciones de origen hispano y asiático (Langer-Gould et al., 2022).

Estudios familiares

En términos de genética de poblaciones, la incidencia de EM en la población general es de aproximadamente el 0,1 %. Sin embargo, los estudios familiares han evidenciado una mayor prevalencia de EM entre parientes de primer grado. En particular, los gemelos monocigóticos presentan un riesgo del 20 al 30 % de desarrollar la enfermedad si su gemelo ha sido diagnosticado, mientras que el riesgo se reduce al 2 al 5 % en gemelos dicigóticos (Balcerac & Louapre, 2022). Esta disminución progresiva del riesgo en función de la distancia genética refuerza la hipótesis de una base hereditaria en la susceptibilidad a dicha enfermedad (Figura 2).

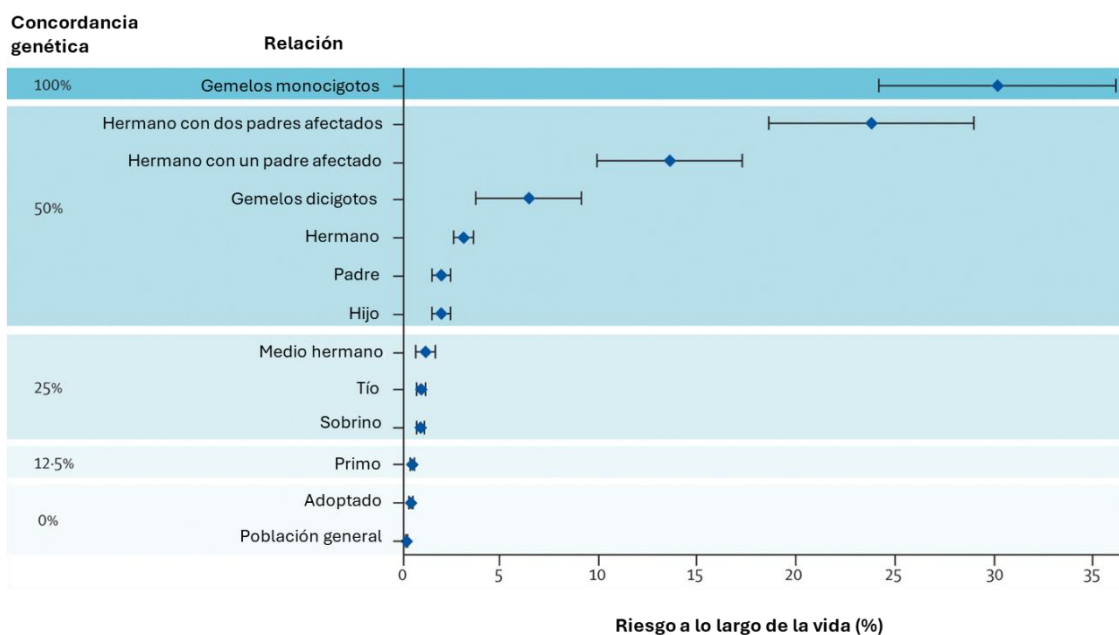


Figura 2. Riesgo de EM en familiares. Riesgos de EM en % ajustados por edad. Las barras de error indican los intervalos de confianza al 95 %. Imagen modificada de *Compston & Coles, 2008*.

Estudios genéticos de asociación

Los estudios de asociación genética consisten en estudiar la segregación de los genes candidatos y el ligamiento entre ellos en familias con más de una persona afectada. Hace más de 30 años se describió la primera asociación genética de la EM con el antígeno leucocitario humano (HLA), localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (Hillert, 1994). La región clase II de este sistema se asocia fuertemente con la EM, en particular con el alelo HLA-DR2 y su correspondiente haplotipo DR15, también denominado Dw2 (DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602). La asociación es fuerte en pacientes de origen caucásico con EM, pero puede apreciarse en la mayor parte de los grupos étnicos. Así mismo, se ha encontrado una asociación con el haplotipo DR4 (DRB1*0405, DQA1*0301, DQB1*0302), con o sin la unión a DR15 en algunas poblaciones mediterráneas como Cerdeña (Marrosu et al., 1998), Turquía (Saruhan-Direskeneli et al., 1997) y en un estudio no replicado en las Islas Canarias (Coraddu et al., 1998).

En las últimas décadas, los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han contribuido significativamente a desentrañar la genética de la EM, revelando una arquitectura poligénica. El Consorcio Genético Internacional para la EM (IMSGC)

encontró una fuerte asociación de los receptores de las interleucinas 2 y 7 (IL2RA e IL7RA) con la EM, además de múltiples SNPs en el locus HLA-DR2 (Hafler et al., 2007).

En 2019, el IMSSGC al examinar más de 47.000 casos y 68.000 controles, identificó 200 variantes autosómicas de susceptibilidad a la EM no relacionadas con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), 32 variantes dentro del CMH, con especial atención al alelo HLA-DRB1*15:01, y una única variante localizada en el cromosoma X. Cabe destacar que la mayoría de las variantes autosómicas no CMH se encontraban en regiones no codificantes del genoma. Además, los investigadores identificaron 551 genes potencialmente afectados por estas variantes, lo cuales se pudieron agrupar en vías de señalización del sistema inmune innato y adaptativo. Los análisis de expresión génica y epigenómicos mostraron una expresión enriquecida de estos genes en diversas células inmunitarias periféricas (células T, células B, células NK, monocitos y células dendríticas), así como en microglía, lo que sugiere la posibilidad de que estas células desempeñen un papel en dirigir un proceso autoinmune hacia el SNC (Patsopoulos et al., 2019).

En un estudio posterior publicado por el IMSSGC en 2023, se investigaron los mecanismos de progresión de la EM en una cohorte de 22.000 sujetos afectados, mediante el análisis de más de 7 millones de variantes genéticas. Los resultados identificaron una asociación significativa con el SNP rs10191329 en el locus *DYSF-ZNF638*. Se observó que portar el alelo de riesgo rs10191329^A en homocigosis acortaba hasta en 3,7 años la mediana de tiempo hasta requerir asistencia para la movilidad y se asociaba con un mayor daño en regiones cerebrales clave, como el tronco encefálico y la corteza cerebral. Curiosamente, esta variante se asoció a una mayor gravedad y progresión de la enfermedad en muestras de tejido cerebral pero no en tejidos relacionados con función inmunitaria, en contraste con los resultados del anterior metaanálisis publicado en 2019. También identificaron una segunda variante, rs149097173^T en el locus *DNM3-PIGC* asociada con una aceleración en el aumento de la discapacidad y un menor tiempo hasta alcanzar una puntuación de 6,0 en la escala EDSS (*del inglés, Expanded Disability Status Scale*). Los genes implicados *DYSF*, *ZNF638*, *DNM3* y *PIGC* se expresan en el cerebro, los tres primeros en las células del linaje de los oligodendrocitos y el último en neuronas cerebrales y en células oligodendrogiales. A la luz de estos resultados, los

investigadores plantean la posibilidad de que la progresión de la EM esté influenciada por mecanismos intrínsecos del SNC, más allá de los mecanismos puramente inmunológicos (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2023).

1.2.2. Factores de riesgo ambiental

Entre los factores ambientales que se han investigado, existe una fuerte evidencia que respalda la asociación entre la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB), el tabaquismo, la deficiencia de vitamina D y un alto índice de masa corporal durante la adolescencia, con un mayor riesgo de desarrollar EM (Fernández et al., 2011).

Como se mencionó anteriormente, la tasa de concordancia de gemelos en la EM se ha utilizado para resaltar la importancia de la herencia en la susceptibilidad a la EM. Paradójicamente, los mismos datos pueden usarse para argumentar la importancia de la influencia ambiental. Es decir, más del 70 % de los gemelos monocigóticos de personas con EM no desarrollan la enfermedad. A pesar de los arduos intentos, no se han encontrado pruebas convincentes de diferencias genéticas, epigenéticas o transcriptómicas que expliquen la discordancia de la EM entre parejas de gemelos monocigóticos (Baranzini et al., 2010), lo que induce a pensar que el riesgo de desarrollar EM está basado en una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales.

Patrones de prevalencia geográfica

Una de las ilustraciones más convincentes sobre el impacto del ambiente en el desarrollo de la EM es su distribución geográfica. La prevalencia de la EM es más alta en los países escandinavos, Canadá y Escocia y más baja en las regiones ecuatoriales. Se han observado gradientes latitudinales en la prevalencia de la EM en los Estados Unidos, con una mayor incidencia en los estados del norte que disminuye gradualmente hacia el sur (Kurtzke, 1980). Similares gradientes latitudinales se ven en los países de América Latina, entre Panamá y Argentina, con un rango de prevalencia entre 0,75 y 21,5 por cada 100.000 habitantes (Risco et al., 2011).

Los estudios de migración poblacional indican que la influencia de factores geográficos en el riesgo de desarrollar EM se establece antes de la adolescencia: los niños preadolescentes que migran asumen el riesgo de su país de adopción, mientras que los

adultos cargan con el riesgo del lugar donde pasaron su infancia. Esto lleva a pensar que durante la infancia se produce la exposición a uno o más factores ambientales que contribuirán al desarrollo de la EM posteriormente, a lo largo de la vida (Segal, 2019).

Vitamina D

El descubrimiento del papel protector de la vitamina D en la EM puede explicar, en parte, su distribución geográfica. La luz ultravioleta cataliza la conversión de la vitamina D a su forma bioactiva, y la prevalencia de la EM es más alta en las regiones con una exposición anual a la luz solar relativamente baja. Por lo tanto, desde los años 70 se ha postulado la vitamina D como un factor que podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la EM. En un estudio que incluyó más de 187.000 mujeres de una cohorte de enfermeras seguida longitudinalmente, se observó que aquellas con una ingesta mayor de suplementos de vitamina D presentaban un menor riesgo de desarrollar EM (Riesgo Relativo = 0,67) que las que ingerían menos (Munger et al., 2004). Asimismo, una revisión sistemática y un metaanálisis que evaluaba la asociación entre los niveles de vitamina D gestacional y el riesgo de desarrollar EM en la progeñie, concluyó que niveles adecuados de vitamina D durante el embarazo podrían ejercer un efecto protector en la descendencia frente al desarrollo posterior de la enfermedad (Jasper et al., 2020).

Por otra parte, un metaanálisis reciente que investigó la vitamina D como terapia complementaria en la EM, concluyó que ésta no tenía ningún efecto terapéutico sobre la discapacidad o la tasa de recaídas a lo largo de la evolución de la enfermedad (Feige et al., 2020).

Además, tres ensayos clínicos aleatorizados que estudiaban la administración de suplementos de vitamina D como complemento al tratamiento con interferón beta (IFN β) no evidenciaron un beneficio claro en cuanto a la actividad de la enfermedad (Camu et al., 2019; Dörr et al., 2020; Hupperts et al., 2019).

La suplementación con vitamina D en el contexto del tratamiento con acetato de glatirámico tampoco redujo el riesgo de brote en pacientes con EM remitente-recurrente (EMRR). Este resultado, junto a los obtenidos en ensayos clínicos anteriores, llevó a los autores a la conclusión de que recetar dosis más elevadas de vitamina D con

el fin de modificar el curso de la enfermedad, podría no aportar beneficios clínicos significativos (Cassard et al., 2023).

Virus de Epstein-Barr

Un estudio epidemiológico publicado en Science demostró la alta prevalencia del virus de VEB en la EM. La investigación, realizada a lo largo de 20 años y con información de más de 10 millones de militares, 955 de ellos con EM, reveló que el riesgo de desarrollar la enfermedad era 32 veces mayor en personas con infección activa por el VEB que por ningún otro virus, y este aumento de riesgo no se podía atribuir a ningún otro factor de riesgo conocido para la EM. Sin embargo, el estudio no ofreció una explicación biológica de cómo el virus podía causar la enfermedad (Bjornevik et al., 2022). En un epígrafe más adelante se tratarán en detalle los posibles mecanismos mediante los cuales el VEB podría desencadenar la EM.

Otros factores de riesgo ambientales

Diversos estudios han establecido una relación consistente entre el tabaquismo activo y un mayor riesgo de desarrollar EM. Una reciente revisión sistemática con metaanálisis, que incluyó más de 100.000 personas con EM y más de 16 millones de controles, encontró que el hábito de fumar se asocia con una probabilidad significativamente mayor de desarrollar la enfermedad (Kusznir Vitturi et al., 2025).

Además, la exposición al humo de tabaco en etapas tempranas de la vida también podría tener implicancias en el desarrollo de la enfermedad. Un estudio de casos y controles realizado en Irán evidenció que el tabaquismo diario por parte del padre, tanto antes del embarazo como durante la gestación, se asoció con un aumento significativo del riesgo de EM en la descendencia. En particular, el tabaquismo paterno antes del embarazo incrementó el riesgo en un 65%, mientras que fumar durante el embarazo elevó el riesgo en un 71%. En contraste, no se halló una asociación significativa con el tabaquismo materno en los mismos periodos (khodadadi et al., 2025).

En nuestro entorno, mediante un modelo de regresión logística multifactorial, hemos demostrado que los pacientes que fumaban tenían 4,4 veces más riesgo de desarrollar EM que los no fumadores, ajustando por sexo y provincia de residencia (Urbaneja et al., 2020).

Por otra parte, la obesidad en los primeros años de vida se asocia al doble de riesgo, tanto en hombres como en mujeres, lo que podría deberse en parte, a unos niveles más bajos de vitamina D en los individuos obesos (Correale & Marrodan, 2022).

1.3. Diagnóstico

Originalmente, el diagnóstico de la EM se basaba únicamente en observaciones clínicas. Sin embargo, en 1983, se introdujeron unos nuevos criterios diagnósticos (Poser et al., 1983) que exigían la demostración de al menos dos lesiones desmielinizantes en el SNC con diseminación en el espacio (DIS) y en el tiempo (DIT). También se requería la exclusión de otras enfermedades que pudieran cursar con los mismos síntomas clínicos.

Estos criterios de Poser categorizaban a los pacientes con EM en función de diversas pruebas clínicas y paraclínicas, como el número de brotes, la presencia de bandas oligoclonales (BOC) de inmunoglobulina G (IgG) y/o un aumento en el índice de IgG en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en comparación con el suero. En 2001, McDonald y su equipo revisaron estos criterios y realizaron ajustes significativos, incluyendo la incorporación de imágenes de resonancia magnética (RMN) en el proceso de diagnóstico (Ian McDonald et al., 2001). Posteriormente, en 2010, el Grupo Europeo de MAGNIMS (Magnetic Resonance Network in Multiple Sclerosis) presentó una revisión de los criterios de McDonald, resaltando la posibilidad de diagnosticar la EM basándose en una única RMN, lo que facilitaría un diagnóstico temprano (Polman et al., 2011).

Estos avances sugieren que los criterios diagnósticos de McDonald, que originalmente se basaban únicamente en observaciones clínicas, ahora están respaldados por pruebas diagnósticas adicionales, como la RMN, el análisis del LCR y los potenciales evocados visuales (PEV) (Brownlee et al., 2017). En la penúltima revisión de los criterios de McDonald (Thompson et al., 2018) se establecieron los siguientes criterios: Si se cumplen los criterios de McDonald 2017 y no hay una mejor explicación para la presentación clínica, el diagnóstico es EM. Si se sospecha EM en virtud de un síndrome clínicamente aislado, pero los criterios McDonald 2017 no se cumplen por completo, el diagnóstico es EM posible. Si surge otro diagnóstico durante la evaluación que explique mejor la presentación clínica, el diagnóstico no es EM.

Recientemente, el International Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple

Sclerosis (IACCTMS), copatrocinado por la European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) y la National MS Society (Estados Unidos), publicó una actualización de los Criterios Diagnósticos de McDonald para el diagnóstico de la EM, cuyo resumen se recoge en la siguiente Tabla 1 (Montalban et al., 2025).

Tabla 1. Actualización de los criterios McDonald para el diagnóstico de EM (2024) (Montalban et al., 2025).

Criterio/Actualización (2024)	Descripción
Incorporación del nervio óptico como quinta localización anatómica	El nervio óptico puede considerarse una quinta región para demostrar diseminación en el espacio (DIS), siempre que no exista una mejor explicación para la patología detectada mediante RM, OCT o potenciales evocados visuales.
Definición de DIS (Diseminación en el espacio)	La DIS se cumple cuando dos de las cinco localizaciones anatómicas (nervio óptico, intracortical o yuxtacortical, periventricular, infratentorial y médula espinal) muestran lesiones típicas, independientemente de si estas son sintomáticas o no.
DIT no obligatoria en algunos casos	La diseminación en el tiempo (DIT) no es obligatoria para diagnosticar esclerosis múltiple (EM) en ciertas situaciones clínicas específicas.
Signo de la vena central en RM	La presencia del signo de la vena central en la RM puede utilizarse para diagnosticar EM en situaciones específicas.
Lesiones con borde paramagnético en RM	La demostración de lesiones con borde paramagnético mediante RM puede emplearse como criterio diagnóstico en determinados casos.
Índice de cadenas ligeras kappa libre	El índice de cadenas ligeras kappa libre puede reemplazar a las bandas oligoclonales como marcador en el diagnóstico de EM.
Síndrome radiológicamente aislado y síntomas inespecíficos	Cuando se cumplen criterios específicos, estos casos se pueden diagnosticar como EM, incluso si la presentación inicial es un síndrome radiológicamente aislado o con síntomas inespecíficos.
Marco unificado para EM pediátrica y adulta	Tanto la EM de inicio pediátrico como la EM de inicio en adultos pueden diagnosticarse utilizando un único marco de criterios diagnósticos.
Unificación de formas progresivas y recurrentes	La EM progresiva y la EM recurrente se integran bajo un diagnóstico unificado, con criterios comunes.
Recomendaciones adicionales para mayores de 50 años	En personas ≥ 50 años con comorbilidades vasculares, se deben considerar criterios adicionales para confirmar el diagnóstico.

Resonancia magnética nuclear

La RMN es un método altamente sensible para la detección de lesiones desmielinizantes del SNC en regiones típicas (Polman et al., 2011). Juega un papel esencial en el diagnóstico de la EM al permitir la determinación de los criterios de DIS y DIT, además de descartar otras patologías. Además, la RMN permite monitorizar la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, lo que la convierte en una herramienta indispensable en la práctica clínica y en ensayos terapéuticos. Según las recomendaciones consensuadas más recientes (MAGNIMS–CMSC–NAIMS, 2021), los signos de actividad radiológica incluyen: (1) la presencia de lesiones nuevas o aumentadas en secuencias T2, que reflejan inflamación o daño reciente, y (2) la captación de gadolinio en secuencias T1, indicativa de ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) y actividad inflamatoria aguda (Wattjes et al., 2021). La Figura 3 muestra las características típicas de las lesiones detectadas por RMN en pacientes con EM.

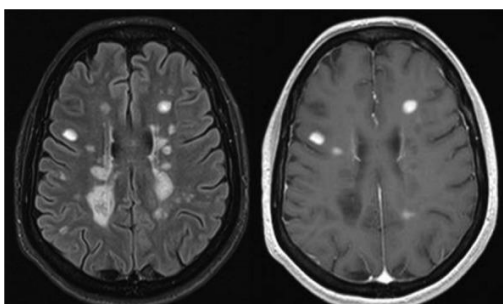


Figura 3. Resonancia magnética nuclear convencional en EM. Secuencias T2-FLAIR (izquierda) y potenciadas en T1 con gadolinio (derecha). La imagen T2-FLAIR muestra múltiples lesiones desmielinizantes focales que son hiperintensas en relación con el tejido cerebral de apariencia normal. Después de la administración de gadolinio, algunas de las lesiones son hiperintensas en las imágenes ponderadas en T1, lo que indica una mayor permeabilidad de la BHE, una característica que distingue las lesiones agudas de las crónicas y que precede a los fenómenos inflamatorios. Imagen extraída de Rovira et al. (2013).

1.3.1. Análisis del líquido cefalorraquídeo

Las BOC son bandas de inmunoglobulina que se observan en el LCR de los pacientes con EM tras un análisis por isoelectroenfoque (Pryce & Baker, 2018). Se introdujeron por

primera vez en 1983 y representan el primer biomarcador utilizado como diagnóstico en la EM (Poser et al., 1983). Las BOC se crean a partir de la IgG y la inmunoglobulina M (IgM) producidas por las células plasmáticas del SNC (Ziemssen & Ziemssen, 2005). La presencia de estas bandas en el LCR y su ausencia en el suero sanguíneo es indicador de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas por parte de uno o más clones de células plasmáticas. Sin embargo, es importante señalar que, aunque las BOC aparecen en alrededor del 90% de los pacientes (Álvarez-Cermeño J.C. & Villar L.M., 2013), no son específicas de la EM y pueden aparecer falsos positivos por otras enfermedades inflamatorias del SNC (Chu et al., 1983). Por lo tanto, las BOC sirven para respaldar el diagnóstico de EM una vez excluidas otras enfermedades. La importancia del análisis del LCR ha adquirido aun mayor relevancia al ser incluido en los criterios McDonald de 2017 por el Panel Internacional sobre el Diagnóstico de la EM (Thompson et al., 2018). En pacientes con un síndrome clínico aislado (SCA) y con demostración clínica o por RMN de DIS o DIT, la presencia de BOC de IgG en el LCR permite demostrar una EM clínicamente definida (EMCD), permitiendo así un diagnóstico temprano de la EM.

Además de las BOC, se puede determinar cuantitativamente la fracción intratecal de las IgG, otro biomarcador que se usa habitualmente en el diagnóstico de la EM. El índice de IgG describe la relación entre el cociente de IgG en el LCR/suero, corregido por el cociente de la proteína de referencia albúmina en el LCR/suero (Lefvert & Link, 1985), y se utiliza como medida de la disfunción de la BHE en la EM (LeVine, 2016). Este índice de IgG se utiliza como marcador de la producción intratecal de IgG, de modo que un valor $> 0,7$ muestra un incremento de la respuesta de las células B intratecales, compatible con la existencia de EM (Comabella & Montalban, 2014). Sólo el 70% de los pacientes con EM tiene un índice de IgG elevado (Bonnar, 2015; Maggi et al., 2018), por lo que este biomarcador tiene menor sensibilidad (Link & Huang, 2006) y especificidad (Cabrera, 2022).

Por otra parte, la acuaporina 4 (AQP-4) es una proteína expresada por los astrocitos, y desempeña un papel importante en la regulación de la homeostasis del agua en el SNC (Mitsdoerffer et al., 2013). Los anticuerpos contra esta proteína son detectables en aproximadamente el 75% de los pacientes con trastorno del espectro de neuromielitis óptica (NMOSD), pero no en pacientes con EM (Flanagan et al., 2016), por lo que es un

biomarcador útil para el diagnóstico diferencial de esta enfermedad en caso de sospecha tras un brote por neuritis óptica.

1.3.2. Potenciales evocados visuales y Tomografía de coherencia óptica

Los PEV y la tomografía de coherencia óptica (TCO) son pruebas complementarias para demostrar implicación objetiva del nervio óptico.

A pesar de reconocer la afectación del nervio óptico como una característica importante de la EM, el grupo que estableció los criterios MAGNIMS en 2016 y basándose en los datos relativos a la sensibilidad y especificidad diagnósticas, concluyó que la inclusión de los PEV o la TCO para demostrar lesiones del nervio óptico en pacientes sin antecedentes claros o evidencia clínica de neuritis óptica, eran insuficientes para apoyar su incorporación a los criterios McDonald en este momento (Filippi et al., 2018).

1.4. Clasificación clínica. Formas evolutivas

En términos generales, los pacientes que desarrollan EM comienzan con un único episodio, denominado SCA, que puede afectar al nervio óptico, al tronco encefálico, a los pedúnculos cerebelosos, a las áreas periventriculares o a la médula espinal, y se resuelve con el tiempo. La mayoría de los pacientes que han experimentado un SCA y presentan una RMN anormal tendrán un segundo episodio de disfunción neurológica o brote, que marcará el inicio de la EM clínicamente definida (Fernández et al., 2011).

El 85-90% de los pacientes presenta un curso clínico caracterizado por la presencia de brotes, más o menos reversibles, repetidos en el tiempo, que se denomina EMRR. Los brotes de la EM pueden desarrollarse durante horas o días, y alcanzar una meseta que dure varias semanas, para luego recuperarse gradualmente. La recuperación clínica de las recaídas suele ser completa en la EMRR temprana; sin embargo, a medida que avanza la enfermedad, la mayoría de las recaídas dejan algún grado de disfunción neurológica.

Aproximadamente un 50% de los pacientes que debutan con EMRR desarrollará entre 10 y 15 años después un curso progresivo [esclerosis múltiple secundariamente progresiva (EMSP)], donde se pasa gradualmente desde los brotes hacia una enfermedad lentamente progresiva. No hay una transición clara entre las dos formas clínicas, ya que los brotes se suceden sobre un fondo de progresión sutil, antes de que

la progresión sea dominante. El porcentaje de pacientes con esta forma clínica está entre el 15% y el 30% (Lorscheider et al., 2016).

Alrededor del 10-15% de los pacientes desarrolla una EM de inicio progresivo denominada esclerosis múltiple primaria-progresiva (EMPP), que se caracteriza por una acumulación gradual de discapacidad progresiva. La presentación más común de esta forma clínica es con una paraparesia espástica progresiva (Miller & Leary, 2007).

Estas definiciones estandarizadas de los cursos clínicos de la EM (EMRR, EMSP y EMPP) se propusieron en 1996 (Lublin & Reingold, 1996); sin embargo, estas definiciones son puramente descriptivas y no proporcionan información sobre la fisiopatología subyacente de la enfermedad. En una revisión posterior se incluyeron modificaciones a esta descripción que incorporaron elementos adicionales como las recaídas, la progresión y la actividad clínica y radiológica. Esto se hizo para reflejar con mayor precisión los parámetros relevantes para el desarrollo de tratamientos contra la EM. Estas modificaciones se incorporaron en los ensayos clínicos que llevaron a las primeras aprobaciones de fármacos para tratar la EMSP (Lublin et al., 2014).

Los pacientes con EM comparten características patológicas cualitativamente similares (pero cuantitativamente diferentes) independientemente del curso clínico, incluyendo la inflamación y la neurodegeneración, las cuales ya están presentes desde el inicio de la enfermedad (Kappos et al., 2020; Moccia et al., 2020; Yong & Yong, 2022). En línea con esta observación, se aprecia una proporción significativa de progresión independiente de la actividad de los brotes (PIRA) en pacientes con EMRR. Como consecuencia de esto, el Comité Asesor Internacional sobre Ensayos Clínicos en Esclerosis Múltiple ha hecho un esfuerzo para revisar en profundidad los descriptores del curso clínico actual, con el propósito de elaborar un nuevo marco de descripción de la enfermedad. En un artículo reciente se plantea que la caracterización clínica y la selección del tratamiento deben basarse no en la descripción clínica tradicional, sino en la identificación de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en la enfermedad (Kuhlmann et al., 2023). Este estudio introduce conceptos relacionados con la fisiopatología de las lesiones y los mecanismos compensatorios como posibles herramientas a emplear en ensayos clínicos e investigación, con el fin de identificar la patogénesis y la evolución clínica de la EM (Figura 4).

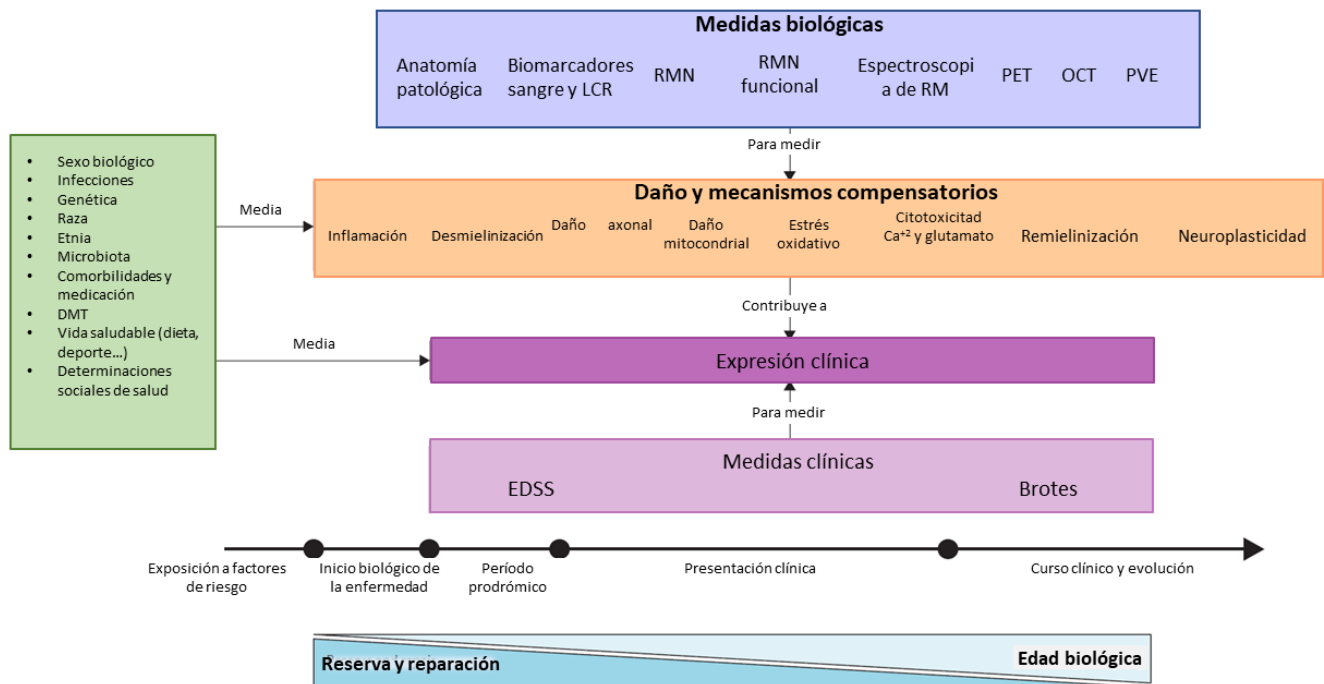


Figura 4. Mecanismos de progresión de la EM. La progresión de la EM es una combinación de “mecanismos de lesión y compensación” (recuadro rojo) que existen de manera simultánea y contribuyen a las manifestaciones clínicas. La activación de los mecanismos de lesión marca el inicio biológico de la enfermedad e inicia el período prodrómico (el período entre el inicio de los mecanismos de la enfermedad y el inicio de signos o síntomas detectables). El equilibrio entre los mecanismos de lesión y reparación determina las manifestaciones clínicas a lo largo del curso de la enfermedad. La disminución de la capacidad de reparación asociada a la edad también influye en la progresión clínica. Se requiere el desarrollo de medidas clínicas y biomarcadores con alta sensibilidad y especificidad para monitorizar la presentación clínica de la EM e identificar los mecanismos relevantes de lesión y compensación en cada individuo. Los posibles mediadores (recuadro azul claro a la izquierda) ejercen influencias positivas y negativas en los mecanismos de lesión y compensación (Kuhlmann et al., 2023).

1.5. Fisiopatología de la EM

La EM se caracteriza principalmente por una actividad inflamatoria aguda acompañada por la ruptura de la BHE. Esto se manifiesta típicamente en la aparición de placas con infiltrados de linfocitos B y T, células plasmáticas y macrófagos congregados alrededor de una vena central en el cerebro y en la médula espinal (Lassmann, 2019). La respuesta aberrante de estos tipos celulares daña oligodendrocitos y neuronas, a la vez que activan a células residentes del SNC como microglía y astrocitos. Por lo tanto, la patología de la EM puede estar vinculada a los procesos de activación de linfocitos autorreactivos,

invasión inmune en el SNC, inmunorregulación y neurodegeneración progresiva, todos ellos controlados por factores genéticos y ambientales (Charabati et al., 2023).

Los subtipos de células T implicadas en la EM incluyen las células T CD8+ y las células T helper CD4+ Th1 y Th17 (Dendrou et al., 2015), que producen citoquinas que pueden contribuir a la patogénesis de la EM, como el interferón gamma (IFN γ), la interleucina IL17, el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) y el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Wagner et al., 2020a).

Aunque las células CD4+ parecen ser las responsables de desencadenar la cascada inflamatoria inicial y la de las recaídas posteriores, las células T CD8+ constituyen la población predominante de células T en las lesiones de EM (Wagner et al., 2020b), encontrándose células T CD8+ con fenotipo de memoria en lesiones mixtas activas/inactivas tisulares y demostrando su expansión clonal en el LCR de pacientes con EM (Fransen et al., 2020).

Aunque históricamente la EM se ha considerado una enfermedad mediada principalmente por las células T, en los últimos años se ha reconocido y caracterizado el papel de las células B en la patogénesis de la EM. Las BOC específicas del LCR son anticuerpos producidos por las células B. Así mismo, las células B producen citoquinas proinflamatorias, como la linfotoxina- α , la IL6, el TNF- α y el GM-CSF en la EM. Se ha observado que la depleción de las células B puede atenuar la actividad proinflamatoria de las células T CD4+ y CD8+ (Bar-Or et al., 2010; Comi et al., 2021). Normalmente, las células B también pueden generar citoquinas antiinflamatorias, como la IL10, la IL35 y el factor de crecimiento transformante β 1; sin embargo, la producción de éstas en los pacientes con EM puede estar alterada. La participación coordinada de estos tipos celulares queda reflejada en la Figura 5.

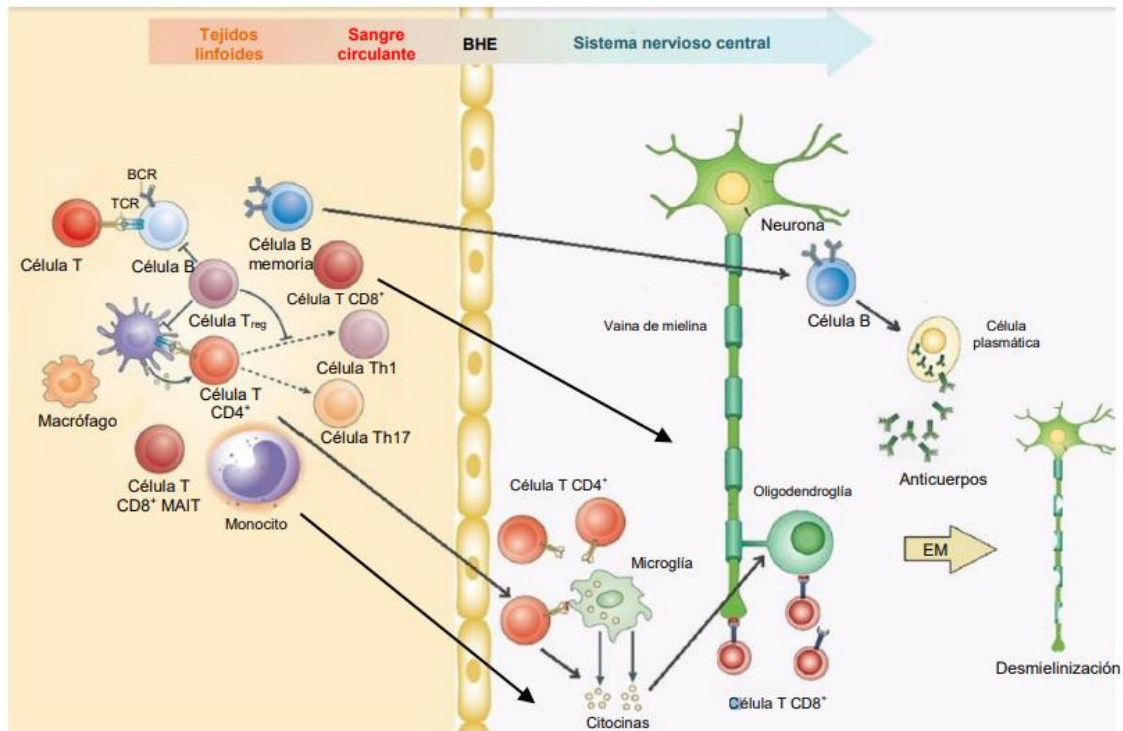


Figura 5. Inmunopatogénesis de la EM. En la EM hay dos pasos esenciales para inducir una respuesta inmunológica en el SNC: el daño a la vaina de mielina y la inflamación. Los fagocitos, linfocitos B, células plasmáticas, células dendríticas, células T CD8⁺, células T CD4⁺ diferenciadas en TH1 y TH17 atraviesan la BHE e ingresan al SNC. Las células plasmáticas liberan grandes cantidades de anticuerpos, las células inmunitarias conducen a la producción de citoquinas inflamatorias, que a su vez atraen a otras células inmunitarias, como los macrófagos, que liberan mediadores inmunitarios dañinos y dirigen un ataque fagocítico contra la vaina de mielina. Figura modificada de Dolati et al., (2017).

Dentro del SNC de los pacientes con EM, se pueden encontrar infiltrados inflamatorios de células B en las meninges. Una carga elevada de estos infiltrados se correlaciona con el grado de lesiones corticales (Magliozzi et al., 2007), la neurodegeneración y la inflamación (Comi et al., 2021). Otros mecanismos patológicos que involucran a las células B en la EM son la presentación de antígenos a las células T y la secreción de moléculas potencialmente tóxicas para los oligodendrocitos (Comi et al., 2021). Se han desarrollado tratamientos modificadores de la enfermedad (TME) como son el rituximab y el ocrelizumab, que deplecionan las células B con anticuerpos monoclonales contra CD20. Estos tratamientos han mostrado ser efectivos tanto en la reducción de brotes en la EMRR como en la ralentización de la progresión de la discapacidad en la EMPP (Montalban et al., 2017), lo que respalda la idea de la participación de la inmunidad humoral en ambas formas clínicas.

En general, se considera que la inflamación aguda, predominante en EMRR, está vinculada a la entrada al SNC de células autorreactivas patógenas procedentes de la periferia, lo que podría eventualmente dar lugar a la formación de estructuras linfoides terciarias menígeas persistentes (van Langelaar et al., 2020). De acuerdo con esta hipótesis, se ha observado que las terapias dirigidas a la infiltración de células autorreactivas en el SNC, como el natalizumab, un anticuerpo monoclonal anti VLA-4, son mucho más efectivas en la EMRR (Kapoor et al., 2018).

Por otro lado, las células gliales desempeñan importantes roles en el control de la neurotransmisión, la fagocitosis, la inflamación, la neurodegeneración y la mielinización. Las células gliales más abundantes en el SNC son los astrocitos, que proporcionan soporte trófico y metabólico para las neuronas, ya que reciclan neurotransmisores del espacio extracelular (H. G. Lee et al., 2022). Los oligodendrocitos mielinizan los axones neuronales del SNC para garantizar una conducción adecuada de los potenciales de acción, al mismo tiempo que brindan soporte adicional para el metabolismo neuronal (Franklin & Ffrench-Constant, 2017). Finalmente, las células microgliales son macrófagos residentes en el SNC que desempeñan un papel clave en la eliminación de restos celulares por fagocitosis y, junto con los astrocitos, en la modulación de la inflamación (Prinz et al., 2021).

La microglía puede cambiar entre un fenotipo proinflamatorio y antiinflamatorio (Geladaris et al., 2021). La microglía activada puede encontrarse en la periferia de lesiones, vinculándose cada vez más con la patogénesis de la EM progresiva, debido a su potencial para facilitar la neurodegeneración (Kamma et al., 2022), aunque también pueden facilitar la remielinización (Zrzavy et al., 2017), independientemente de su función en la eliminación de los restos de mielina (Baaklini et al., 2023) y la reparación neuronal (Geladaris et al., 2021). Además, se ha descubierto que la microglía expresa la tirosinquinasa de Bruton (BTK), lo que ha generado un creciente interés en los inhibidores de BTK como posibles opciones terapéuticas tanto para la EMRR como para la EMSP y la EMPP (Geladaris et al., 2021).

También se ha planteado la posibilidad de que la microbiota intestinal pueda alterar el marco inmunopatológico de la EM. Por un lado, la disbiosis intestinal podría fomentar la inflamación en lugares distantes. Por otro lado, el mimetismo molecular entre

antígenos intestinales y epítomos del SNC podría seleccionar clones de células autoinmunes. Además, la microbiota también produce metabolitos que afectan directamente al SNC y regulan la comunicación entre subpoblaciones de astrocitos y microglía (Rothhammer et al., 2018).

Asimismo, el sistema de complemento desempeña un papel significativo en la EM, influyendo en la modulación de citoquinas y la permeabilidad de la BHE. En modelos de EAE, se ha señalado que tanto la bradicinina (BK) como el sistema de complemento, especialmente mediante la activación del receptor B1 de BK, contribuyen significativamente a la inflamación y al aumento de la permeabilidad vascular (Huang et al., 2022). Además, el sistema de complemento está implicado en la fagocitosis de mielina en lesiones agudas, pero también se ha observado su depósito en lesiones crónicas de pacientes con EMPP y en lesiones en la materia gris (Tatomir et al., 2017). Se cree que puede tener un papel complejo en la patogénesis de la enfermedad, porque no se limita solo a la eliminación de restos celulares, sino que también participa en la remodelación y mantenimiento de estructuras sinápticas (Presume et al., 2017). Estudios de biomarcadores en plasma y LCR han mostrado un aumento en componentes del complemento en todas las formas clínicas de la EM, lo que refleja una activación sostenida de este sistema en la EM (Aeinehband et al., 2015).

En este contexto, además de los mecanismos inmunitarios clásicos, se ha intensificado el interés por comprender el papel de agentes infecciosos en la patogénesis de la EM. En particular existe un creciente interés por descubrir los posibles vínculos entre la infección por VEB y la patogénesis de la EM. Estudios recientes han identificado células B infectadas por VEB en el cerebro de pacientes con EM (Soldan & Lieberman, 2022; Bose et al., 2024; Wahbeh & Sabatino, 2025). Sin embargo, se desconoce el modo por el que las células B infectadas por VEB originan la EM, aunque actualmente se postulan tres posibles mecanismos (Figura 6).

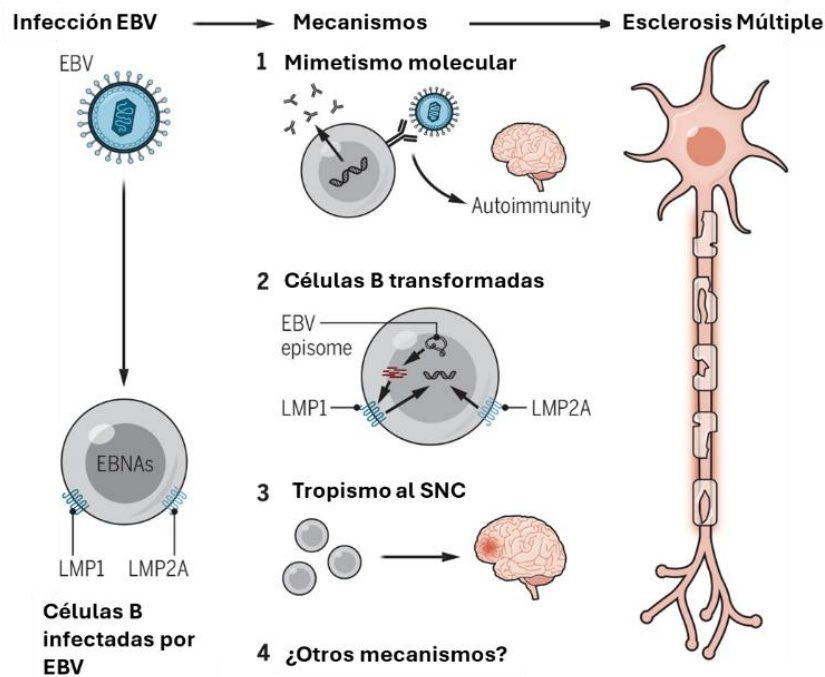


Figura 6. Células B infectadas por VEB en la EM. Posibles mecanismos que describen el modo en que las células B infectadas por VEB, afectan a la patogenicidad de la EM. Imagen modificada de Robinson & Steinman, 2022

l) **Mimetismo molecular:** a través del cual secuencias de proteínas virales del VEB mimetizan proteínas de la mielina y otras proteínas del SNC, induciendo así autoinmunidad por reacción cruzada contra estas proteínas.

En este sentido, un estudio reciente encontró un anticuerpo contra el antígeno nuclear 1 del VEB (EBNA1) en el LCR de un paciente con EM y demostraron la alta afinidad y reactividad cruzada entre este antígeno y la proteína CAM de las células gliales (GlialCAM) (Figura 7). Hallaron estos anticuerpos con reactividad cruzada en un 20-25% de los pacientes con EM y demostraron también que la inmunización en ratones con EAE con este epítipo EBNA1 exacerbaba la desmielinización autoinmune (Lanz et al., 2022).

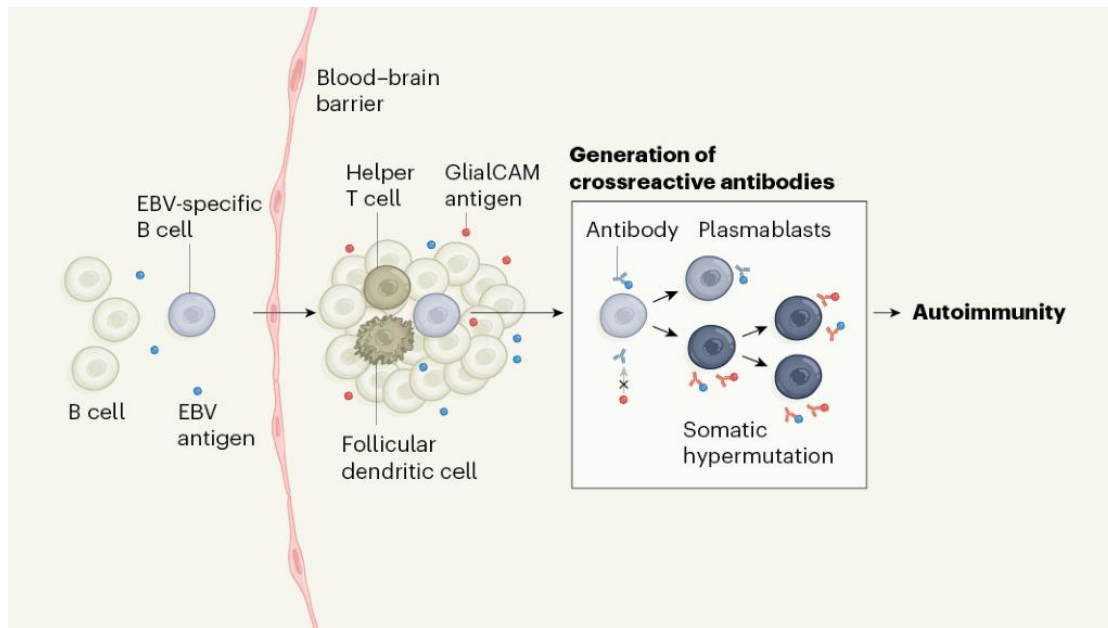


Figura 7. Conexión entre la infección por virus EBV y la disfunción inmune en la EM. Lanz et al. analizaron células B de personas con EM y mostraron que estas producen anticuerpos que reconocen un epítipo del virus, EBNA1. Tras atravesar la BHE forman agregados donde las células B específicas de VEB, ayudadas por las células T helper y las células dendríticas, reconocen el antígeno. Las células B específicas de VEB experimentan un cambio llamado hipermutación somática (somatic hypermutation). Esto altera la especificidad de los anticuerpos que producen, cambiando la generación de anticuerpos que reconocen sólo el antígeno VEB (azul), por anticuerpos capaces de reconocer los antígenos tanto del VEB como de la proteína cerebral GlialCAM (rojo). La generación de anticuerpos contra GlialCAM podría conducir a la autoinmunidad, sello distintivo de la EM. Imagen tomada de (Wekerle, 2022).

II) Transformación de células B: La transformación del VEB en las células B también podría dar lugar a la expansión clonal de células plasmáticas patogénicas. El VEB puede transformar las células B a través de la interrupción de varias vías: la proteína de membrana latente 2A del VEB (LMP2A) que mimetiza la señalización del receptor de células B (BCR), y la LMP1 que mimetiza la señalización del receptor CD40, una vía de coestimulación importante para la interacción entre las células B y T.

III) Tropismo al SNC: En las lesiones cerebrales de la EM se han encontrado células T CD8⁺ específicas para proteínas líticas del VEB. Una infección persistente por VEB en el SNC podría estimular respuestas de células T CD8⁺ que causarían lesiones en el SNC.

Estas teorías no implican que el VEB sea el causante de la EM, sino más bien que mecanismos inmunológicos desencadenados por la infección del VEB, en combinación con otros factores ambientales y/o genéticos, podrían desencadenar el inicio de la enfermedad en individuos susceptibles.

1.6. Biomarcadores

La EM presenta una amplia variabilidad clínica y un curso impredecible, lo que dificulta su diagnóstico temprano y la estratificación de sus formas clínicas. Las manifestaciones clínicas, las valoraciones paraclínicas y la RMN anteriormente mencionados, son los medios con los que se cuenta actualmente para diagnosticar y monitorizar la actividad clínica de la EM a lo largo del tiempo. De hecho, los criterios de McDonald de 2017 se basan principalmente en la RMN, una herramienta que requiere de conocimientos especializados para su interpretación, además de ser costosa y no proporcionar alta especificidad. Aunque esta herramienta es excelente para identificar nuevas lesiones inflamatorias activas, es insuficiente para diferenciar las formas clínicas de EM o cuantificar la progresión. Por ese motivo, los biomarcadores líquidos, especialmente en sangre u otros fluidos corporales no invasivos, presentan un gran potencial para abordar la necesidad no cubierta de identificar marcadores válidos, fiables y accesibles para el diagnóstico y progresión de la EM (Gill et al., 2023).

La importancia del diagnóstico temprano radica en la posibilidad de iniciar un tratamiento de manera oportuna, lo que puede disminuir la discapacidad neurológica a largo plazo (Freedman et al., 2014). Por otro lado, un diagnóstico erróneo no solo expone al paciente a tratamientos innecesarios, sino que también genera alto coste tanto para él como para el sistema de salud (Solomon & Corboy, 2017). A pesar de la mejora en el diagnóstico con los criterios actuales, todavía existe margen de error; entre un 5 y un 41% de las personas diagnosticadas con EM no presentan la enfermedad, como se recoge en un reciente metaanálisis (Zürrer et al., 2024). De la misma manera, los pacientes pueden recibir un diagnóstico tardío: los primeros signos son interpretados de forma equivocada o no evaluados a tiempo, y sólo más adelante se reconocen como manifestaciones iniciales de la EM. Esto no sólo retrasa el inicio del tratamiento, sino

que también se asocia a una mayor carga de enfermedad (Solomon et al., 2025; Uher et al., 2023).

1.6.1. Biomarcadores clásicos en LCR

Como hemos mencionado previamente, la presencia de BOC IgG en el LCR es la alteración de laboratorio más consistente en pacientes con EM (Poser et al., 1983). Las BOC IgG son indicativas de actividad inflamatoria en el SNC y pueden detectarse en más del 95% de los casos, lo que las convierte en un biomarcador diagnóstico muy sensible, pero poco específico, ya que no son exclusivas de la EM (Fitzner et al., 2015). Aunque las BOC IgG se eliminaron de los criterios diagnósticos de McDonald en 2010 para la EMRR, siguen siendo un criterio para el diagnóstico de la EMPP. Pero también tienen valor como factor pronóstico, ya que su presencia predice la conversión de SCA a EMCD (Paul et al., 2019).

Por otra parte, las BOC IgM se encuentran en alrededor del 40% de los pacientes con EM y del 20% de aquellos con SCA. Su presencia en LCR también se asocia fuertemente con una conversión a EMCD en pacientes con SCA (Pfuhl et al., 2019). Además, se correlacionan con una evolución más agresiva de la EM (Mandrioli et al., 2008) y con una mayor discapacidad no sólo a corto plazo (Villar et al., 2003) sino también a largo plazo (Capuano et al., 2021). Adicionalmente, en pacientes con EMPP, se asocian a un fenotipo de enfermedad inflamatoria activa (Villar et al., 2014).

La especificidad antigénica de la mayoría de las BOC IgM está dirigida contra lípidos de la mielina, fundamentalmente contra la fosfatidilcolina (Villar et al., 2005). La presencia de BOC IgM lípido-específicas se ha asociado a las formas clínicas de inicio en brotes, pero no a la EMPP (Villar et al., 2009). Se conoce, además, que sus niveles no varían a lo largo del curso de la enfermedad, al contrario de las BOC IgM no lípido-específicas que desaparecen unos años después del diagnóstico. Su presencia, al inicio de la EM, se asocia con un curso más agresivo de la enfermedad (Villar et al., 2005), con una mayor frecuencia de recaídas y progresión de la discapacidad a largo plazo (Thangarajh et al., 2008; Villar et al., 2007), así como con una mayor carga lesional y atrofia cerebral por RMN cuando aparecen en el SCA (Magraner et al., 2012).

Adicionalmente, el Índice de IgG mide la síntesis intratecal de esta inmunoglobulina. Su elevación es un hallazgo frecuente en la EM que (Fitzner et al., 2015).

Por otra parte, la glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG) es una proteína de mielina expresada exclusivamente en la superficie de las vainas de mielina y en las membranas de los oligodendrocitos. Los anticuerpos anti-MOG no son adecuados para el diagnóstico o pronóstico de la EM, sino para el diagnóstico diferencial frente a la enfermedad autoinmune asociada a anticuerpos IgG anti-MOG (MOGAD). Se han encontrado también anticuerpos anti-MOG en pacientes pediátricos con encefalomiелitis aguda diseminada, pacientes con NMOSD y pacientes con neuritis óptica bilateral (Peschl et al., 2017). Sin embargo, en la EM clásica, títulos altos de anticuerpos anti-MOG son raros y se encuentran mayoritariamente en EM infantil (McLaughlin et al., 2009).

Entre los biomarcadores pronósticos en LCR, los niveles de *parvalbúmina* (PVALB) en el momento del diagnóstico de EM se correlacionan con el número de lesiones corticales y la atrofia cerebral por RMN, y con el deterioro cognitivo grave (Magliozzi et al., 2021). Asimismo, los niveles de *CD146 soluble* están aumentados en pacientes con EM activa frente a aquellos con enfermedad inactiva (Heim et al., 2020). Los niveles de *IL6* también se asocian con la actividad de la enfermedad definida clínica y/o radiológicamente (Stampanoni Bassi et al., 2020). Por otra parte, la concentración de *amiloide* se ha identificado como un factor predictivo de discapacidad a los 3 años de seguimiento (Pietroboni et al., 2018). Por último, los niveles de *KIF5A* se correlacionan con la progresión documentada de la enfermedad a los 2 años de seguimiento clínico y con la gravedad de la misma en pacientes con EMRR (Hares et al., 2021).

1.6.2. Otros biomarcadores líquidos emergentes

Actualmente, se está llevando a cabo una investigación en constante crecimiento para identificar biomarcadores en fluidos que puedan servir como herramienta de diagnóstico o pronóstico para la EM. Esta aproximación promete ser accesible, factible desde el punto de vista logístico y, al mismo tiempo, precisa. Entre los principales biomarcadores estudiados destacan:

Subunidades ligeras de neurofilamentos

La cadena ligera de los neurofilamentos (NfL) es una proteína del citoesqueleto neuronal que se postula como biomarcador robusto de neurodegeneración. Los neurofilamentos son filamentos intermedios específicos de las neuronas. Cuando la neurona pierde la integridad de membrana, los neurofilamentos se liberan al espacio extracelular y finalmente, al LCR y a la sangre. Tanto la cadena ligera de NfL como otros neurofilamentos no son específicos de la EM y pueden elevarse debido a cualquier causa de daño axonal focal grave, incluidos otros trastornos neuroinflamatorios del SNC, como NMOSD o MOGAD, o neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (Khalil et al., 2024).

Los niveles de NfL en el LCR son un marcador preciso de lesión neuroaxonal aguda, y se asocian a la inflamación y la actividad de la EM, pero también a la discapacidad clínica y la atrofia cerebral a corto y largo plazo (Kuhle et al., 2020) así como a la conversión del SCA o del síndrome radiológico aislado (SRA) a EMCD (López-Gómez et al., 2023; Matute-Blanch et al., 2018).

En cuanto a los parámetros de sangre periférica, los niveles séricos de NfL (sNfL) evaluados mediante la tecnología SiMOA se han postulado como el marcador predictivo más potente. Varios estudios han demostrado que el nivel de sNfL se correlaciona estrechamente con el de NfL en el LCR (Disanto et al., 2017; Loonstra et al., 2022; Novakova et al., 2017), lo que convierte a los sNfL en un posible biomarcador no invasivo del daño neuronal en el SNC. Estos estudios revelan que los niveles de NfL en LCR y sNfL son más elevados en pacientes con EM en comparación con individuos sanos o aquellos con trastornos neurológicos no inflamatorios.

Una vez ajustados por edad, los niveles de sNfL se han asociado sistemáticamente con la actividad clínica y radiológica de la enfermedad (Preziosa et al., 2020; Srpova et al., 2021) y se han correlacionado con un mayor grado de atrofia cerebral y medular, así como con el empeoramiento de las funciones neurológicas (Sotirchos et al., 2023). También se han relacionado con la respuesta al tratamiento (Barrero Hernández et al., 2024; Rodríguez-Jorge et al., 2024); sin embargo, existen resultados inconsistentes respecto a su valor predictivo en la progresión de la enfermedad (Chitnis et al., 2025).

Si bien los sNfL constituyen un biomarcador útil en diversos ámbitos del estudio de la EM, hasta la fecha pocos estudios han evaluado su capacidad predictiva a nivel individual. Esta limitación se debe, en parte, a la influencia de factores externos que pueden aumentar sus niveles, como la edad, el índice de masa corporal, la función renal deteriorada, la diabetes mellitus y el tabaquismo, lo que subraya la necesidad de normalizar los valores sNfL para corregir estos determinantes (Benkert et al., 2022; Sotirchos et al., 2023; Vermunt et al., 2022).

Quitinasa tipo 3

La Quitinasa tipo 3 (CHI3L1/YKL-40) es una glicoproteína proinflamatoria de función desconocida, que se ha propuesto como potencial marcador de astrocitos y microglía/macrófagos reactivos, aunque también se expresa en células de la periferia, como monocitos, condrocitos, neutrófilos y células musculares lisas vasculares, entre otras (Bonneh-Barkay et al., 2010; Canto et al., 2015).

Niveles elevados de CHI3L1 en LCR de pacientes con SCA se asocian con una mayor progresión de la discapacidad (Canto et al., 2015; Comabella et al., 2010). Varios metaanálisis han demostrado que los niveles de CHI3L1 en el LCR son más altos en pacientes con EM que en controles sanos, más elevados en EMPP que en EMRR y EMSP, y superiores en aquellos pacientes con SCA que convirtieron a EMCD en comparación con los que no lo hicieron (Floro et al., 2022; Momtazmanesh et al., 2021; Tamam et al., 2021).

Además, se ha observado que el aumento de CHI3L1 en el LCR se correlacionaba con el número de brotes, el volumen de lesiones en T2, la EDSS y la discapacidad motora y cognitiva (Talaat et al., 2023).

También se han encontrado niveles elevados de CHI3L1 en el plasma y suero de asociados con la pérdida de volumen cerebral en pacientes con EMPP (Ahola et al., 2025; Fissolo et al., 2023a), y con el número de brotes y la discapacidad motora medida por EDSS en pacientes EMRR (Khedr et al., 2025). Sin embargo, otros estudios han demostrado que los niveles de CHI3L1 en el LCR no se correlacionan con los niveles séricos, lo que limita su utilidad como biomarcador sérico (Abdelhak et al., 2019; Pomary et al., 2023; Tamam et al., 2021).

Proteína ácida fibrilar glial

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es un filamento intermedio del citoesqueleto de los astrocitos y un marcador de reactividad de astrogliosis y de daño astrogliar. La GFAP puede liberarse al LCR, atravesar la BHE y pasar a la sangre (Plog et al., 2015). La elevada correlación entre los niveles de GFAP en LCR y en sangre sugiere que los niveles en suero podrían estar reflejando el daño del SNC (Abdelhak et al., 2018).

Aunque se cree que una respuesta astrocítica en cierta medida puede ser beneficiosa, se considera que los astrocitos patológicamente reactivos son impulsores clave del daño neurológico en la EM (Ponath et al., 2018).

Los primeros estudios que midieron los niveles de GFAP en el LCR de pacientes con EM hallaron una correlación de sus niveles con la discapacidad neurológica en los años posteriores (Axelsson et al., 2011), así como con una mayor rapidez en la progresión a una EDSS de 3 y 6 (Martínez et al., 2015) y unos niveles más elevados en EMPP que en EMRR, todo ello recogido en la revisión de Meier et al., (2023).

Sin embargo, en un metaanálisis posterior, se encontró que el nivel de GFAP en el LCR fue significativamente inferior en el grupo de pacientes con EM progresiva que en los pacientes con EMRR. Además, los pacientes con EMRR también presentaron niveles más altos que los controles sanos, y mostraron niveles notablemente más elevados durante las recaídas que durante los periodos de remisión (Sun et al., 2021).

Igualmente, el nivel de GFAP en LCR se correlacionó positivamente con la duración de la EM, lo que refleja el fenómeno de astrogliosis a lo largo de la progresión de la enfermedad (Rival et al., 2022).

Por otro lado, los niveles de GFAP en suero (sGFAP) se encontraron aumentados en la EM y se asociaron con la discapacidad clínica medida por EDSS, con la gravedad y progresión de la enfermedad, así como con la carga lesional y el daño en la sustancia blanca (Ayrygnac et al., 2020; Högel et al., 2020; Meier et al., 2023; Saraste et al., 2021).

Respecto a su asociación con las diferentes formas evolutivas, los hallazgos son controvertidos. Algunos estudios mostraron que los niveles de sGFAP estaban ligeramente elevados en pacientes con EMRR en comparación con controles sanos y

pacientes con trastornos neurológicos no inflamatorios (Abdelhak et al., 2018; Niiranen et al., 2021; Sharquie IK, et al. Medeni Med J 2020). Otros autores encontraron que los niveles de sGFAP en pacientes con EMRR estable eran similares a los controles sanos y que sólo aumentaban en aquellos con brotes recientes (Watanabe et al., 2019). Estudios más recientes mostraron que la sGFAP estaba elevada en pacientes con EM progresiva en comparación con EMRR (Barro et al., 2022; Högel et al., 2020; Loonstra et al., 2022), por lo que se ha propuesto como marcador relacionado con la progresión de la enfermedad (Högel et al., 2020).

Numerosos estudios han investigado la correlación entre los niveles de GFAP y NfL (Abdelhak et al., 2018; Ayrignac et al., 2020; Barro et al., 2022; Högel et al., 2020). Estos últimos autores demostraron que concentraciones séricas más elevadas de GFAP y de NfL se asociaron con puntuaciones más altas en la escala EDSS, mayor edad, mayor duración de la enfermedad, un curso progresivo de la enfermedad así como con actividad por RMN, y sugieren que sus niveles se podrían utilizar para estratificar los pacientes, ya que los niveles elevados de sGFAP correlacionaban con progresión, especialmente en pacientes sin recaídas, mientras que los niveles elevados de sNfL reflejaban la actividad aguda de la enfermedad en pacientes con EM con alto riesgo de progresión (Högel et al., 2020). Otro grupo propuso una “puntuación glial” que integra múltiples biomarcadores (GFAP x CHI3L1 / sNfL), y encontraron que estaba más elevada en pacientes con formas EMSP que en pacientes con EMRR, y se correlacionaba con la discapacidad por EDSS en pacientes con EMSP (Huss et al., 2020). Evaluar simultáneamente tanto el NfL como el GFAP, y posiblemente otros biomarcadores, puede ser útil para diferenciar la EM en diferentes etapas de la enfermedad y puede ayudar con el pronóstico y la respuesta al tratamiento.

Citoquinas y quimiocinas

En relación con las citoquinas y quimiocinas, CXCL13, LIGHT y APRIL destacan como las moléculas más sólidamente asociadas con la actividad de la enfermedad. Además, los niveles elevados en LCR de CXCL13, TNF, LIGHT, sCD163 y TWEAK se han vinculado con un mayor daño cortical en pacientes con EMRR (Magliozzi et al., 2020).

La desregulación de las vías TNF y de sus receptores solubles 1 y 2 (sTNF-R1/2) en LCR, también se asocia con perfiles clínicos y de resonancia magnética específicos, que pueden identificarse desde el momento del diagnóstico, contribuyendo así a la predicción del curso de la enfermedad. Estos autores describieron que los niveles elevados de TNF en LCR se correlacionaban con un incremento de la puntuación en la escala EDSS, así como con la presencia de brotes y de lesiones en la sustancia blanca. Por su parte, el incremento de sTNFR1 en LCR se asociaba con el volumen de lesiones corticales y con la aparición de nuevas lesiones.

También describieron patrones proteicos en LCR en el momento del diagnóstico asociados con aumentos de expresión de:

- TNF (acompañados de elevaciones en LCR de los niveles de BAFF, IFN- γ , IL1 β , IL10, IL8, IL16, CCL21, haptoglobina y fibrinógeno), que se asociaban a vías de respuesta inmune innata y adaptativa.
- sTNFR1 (acompañados de niveles elevados de CXCL13, TWEAK, LIGHT, IL35, osteopontina, pentraxina-3, sCD163 y CHI3L1), que se relacionó con alteraciones en la señalización de células T y B.
- sTNFR2 (asociados a niveles elevados de IFN- β y sIL6R α y disminuidos de IFN- λ 2) se vinculó con la diferenciación de células Th, y la maduración de células dendríticas (Magliozzi et al., 2021).

Por otra parte, CXCL13, el ligando del receptor celular B CXCR5, es un importante quimioatrayente encargado de reclutar células B al SNC. Se le relaciona con la formación de folículos linfoides ectópicos en el SNC en la EM, especialmente en las formas progresivas (Zhan et al., 2021). Diversos estudios han demostrado que sus niveles están aumentados en el LCR en la EM, especialmente en las formas EMRR (Krumbholz et al., 2006; Zhan et al., 2021). Los niveles elevados de CXCL13 en el LCR se asocian a pleiocitosis y presencia de BOC IgG en pacientes con SCA y pueden predecir la conversión de SCA a EMCD (Lucchini et al., 2023). Además, se correlacionan con la evolución clínica en la EMRR, concretamente con la tasa de brotes, la discapacidad y la atrofia cerebral cortical por RMN (DiSano et al., 2020).

Asimismo, los TME son capaces de disminuir los niveles de CXCL13 tanto en el LCR como en el suero (Fissolo et al., 2022; Karaaslan et al., 2022). También, niveles basales de CXCL13 más bajos en suero se han asociado a una mejor respuesta al fingolimod. Mientras que algunos autores defienden que los niveles de CXCL13 en LCR podrían ser útiles como biomarcadores pronósticos del SCA y de actividad de la EM, y que sus niveles séricos podrían ser un biomarcador de respuesta a los TME, especialmente a los fármacos que deplecionan las células B (Kim, 2023), otros señalan que los niveles de CXCL13 en suero no son un buen predictor de los niveles en el LCR, especialmente cuando estos últimos son elevados, lo que limita mucho su potencial como biomarcador (Gill et al., 2023).

Respecto a la Osteopontina, una glicoproteína de la matriz extracelular, sus concentraciones en LCR y suero se encontraron incrementadas en los pacientes con EM en comparación con los controles (siendo mayores en las formas EMRR y seguidos, en orden, por las EMPP, SCA y EMSP). Su elevación se asociaba con la actividad clínica, es decir, con la aparición de recaídas y con la gravedad clínica, así como con la progresión de la discapacidad (Agah et al., 2018; Kim, 2023).

En lo relativo al pronóstico de la EM, además de los previamente mencionados, los niveles basales elevados de Adiponectina en el suero de pacientes con EM proporcionan un riesgo significativamente mayor de progresión y gravedad (Signoriello et al., 2019) y los niveles elevados de Calprotectina pueden representar un biomarcador clínicamente útil de la actividad de la enfermedad (Olsson et al., 2020).

microARN

Los microARN están emergiendo como biomarcadores de gran relevancia debido a su capacidad para modular la expresión génica, su participación en procesos clave de la patogénesis y su notable estabilidad en fluidos biológicos (Gao et al., 2021). En el contexto de enfermedades neurológicas como la EM, numerosos estudios han demostrado que distintos perfiles de miARN pueden reflejar actividad inflamatoria, progresión de la enfermedad y respuesta inmunológica (Muñoz-San Martín et al., 2019; Ebrahimkhani et al., 2017; Marangon et al., 2020). Esto los posiciona como herramientas prometedoras tanto para el diagnóstico temprano (Alkhazaali-Ali et al., 2024; Muñoz-

San Martín et al., 2020) como para la estratificación pronóstica y el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas (Mohseni et al., 2025; Maciak et al., 2021). Sin embargo, su implementación clínica todavía requiere validar su reproducibilidad y especificidad, dado que persisten inconsistencias entre estudios (Gill et al., 2023).

Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VE) se perfilan como biomarcadores emergentes de gran interés, dado que transportan proteínas y material genético que reflejan el estado funcional de las células que las liberan. Las VE derivadas de neuronas y células gliales pueden detectarse en sangre y LCR, lo que abre la posibilidad de disponer de indicadores no invasivos de procesos como la neuroinflamación (Sáenz-Cuesta et al., 2014), el daño oligodendroglial (Galazka, 2018) o la actividad lesional (Bravo-Miana et al., 2024). La evidencia creciente que vincula perfiles específicos de VE con brotes, progresión y conversión temprana a formas definidas de EM refuerza su potencial diagnóstico y pronóstico (Agliardi et al., 2023; Cuomo-Haymour et al., 2022; Geraci et al., 2018). No obstante, su incorporación clínica aún requiere profundizar en la identificación precisa de sus subtipos celulares y en la validación de su especificidad y valor pronóstico.

1.7. Procesamiento alternativo o splicing alternativo del ARN mensajero

El procesamiento alternativo es el proceso post-transcripcional que permite la generación de diferentes ARN maduros a partir de un solo transcrito primario, que da lugar a diversas familias de isoformas proteicas con una variedad de funciones. Alrededor de dos tercios de los genes humanos codificantes y no codificantes contienen múltiples intrones y los eventos de procesamiento alternativo ocurren en más del 90% de estos genes (Nikom & Zheng, 2023), lo que permite que una sola secuencia de genoma pueda dar lugar a múltiples variantes de ARNm por diferentes combinaciones de exones (Figura 8). Esto es esencial para la diversidad funcional de proteínas en organismos multicelulares, ya que diferentes isoformas de una proteína pueden tener funciones específicas en diferentes tejidos o en diferentes momentos del desarrollo.

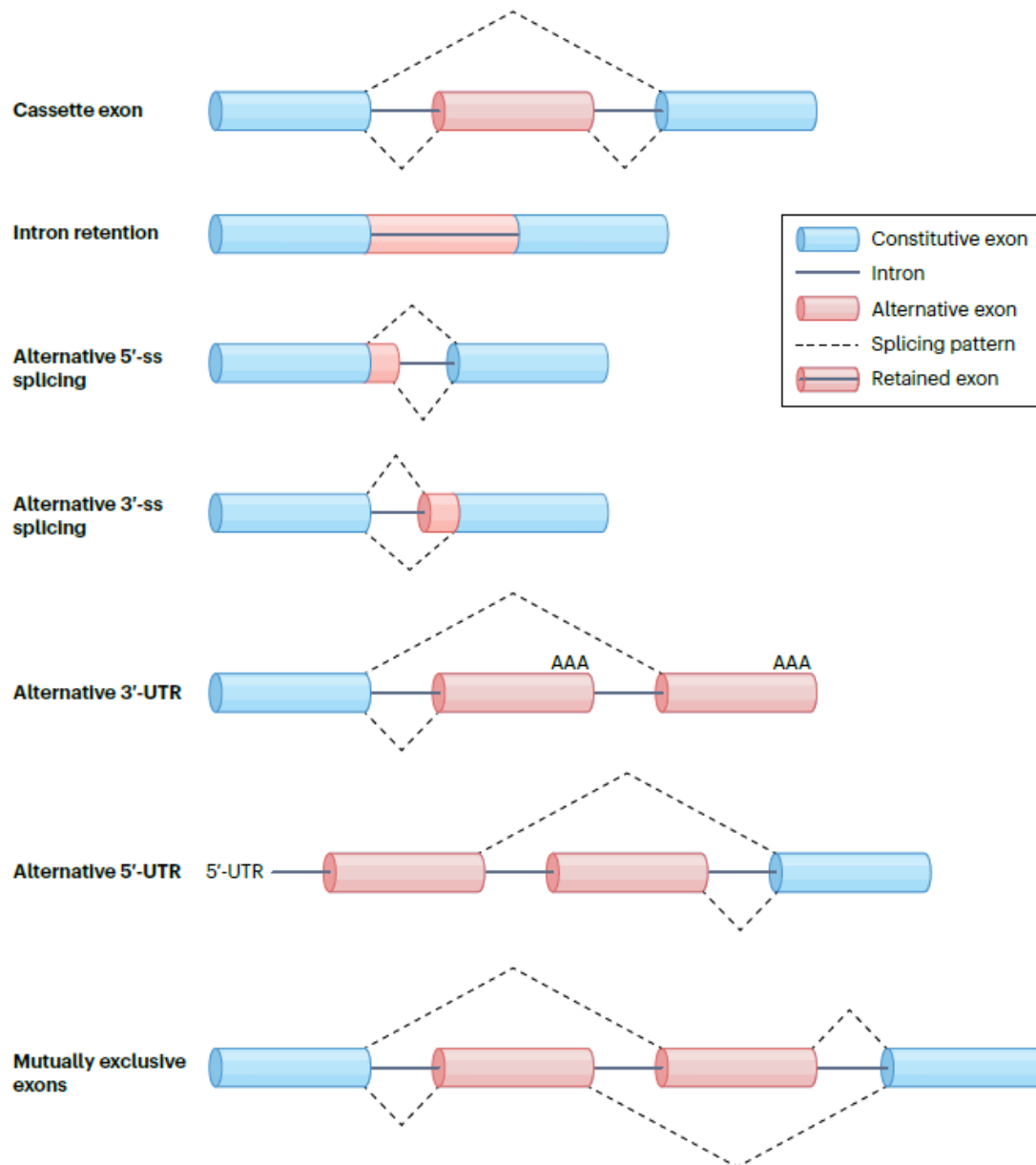


Figura 8. Patrones de procesamiento alternativo de pre-ARNm en genes eucariotas. En el pre-ARNm, los exones constitutivos (cilindros azules) y los exones alternativos o fragmentos de exones (cilindros rojos) están conectados por intrones (líneas sólidas horizontales), que pueden ser excluidos o incluidos (cilindro rojo con línea negra horizontal). Las líneas punteadas indican patrones de procesamiento alternativo. Ss, sitio de empalme; UTR, región no traducida. Imagen tomada de (Nikom & Zheng, 2023).

1.7.1. Regulación del procesamiento alternativo

El procesamiento del pre-ARN mensajero es un mecanismo regulador del ARN en genes eucariotas. La escisión de intrones y la unión de exones se lleva a cabo por el espliceosoma o complejo de empalme, que es una maquinaria molecular compuesta por 5 ribonucleoproteínas (RNP), capaz de detectar y eliminar las secuencias intrónicas

(Figura 9). El procesamiento alternativo está regulado por factores de splicing (activadores o represores) que se unen a estas RNP para promover o inhibir la actividad del espliceosoma. El procesamiento del pre-ARN mensajero puede ser constitutivo, donde un exón se incluye siempre en el transcripto final, o alternativo, cuando la inclusión u omisión de cierto exón o parte de un exón depende del contexto celular (Nikom & Zheng, 2023).

En neuronas sanas, la expresión de los activadores y represores de splicing regula los patrones fisiológicos de procesamiento alternativo (Figura 9A). Como se muestra en la Figura 9B, las neuronas afectadas por enfermedades neurodegenerativas muestran patrones anormales de procesamiento alternativo. Por un lado, la inhibición de activadores de splicing puede dar lugar a un ARNm que carece del exón, lo que puede generar isoformas proteicas patológicas que afectan la función neuronal. Por otro lado, la inhibición de represores de splicing puede generar variantes patológicas de inclusión de exones que cambian el marco de lectura del ARNm, lo que conduce hacia la degradación del transcrito mediada por codones de parada prematuros (en inglés, *nonsense-mediated decay*, NMD).

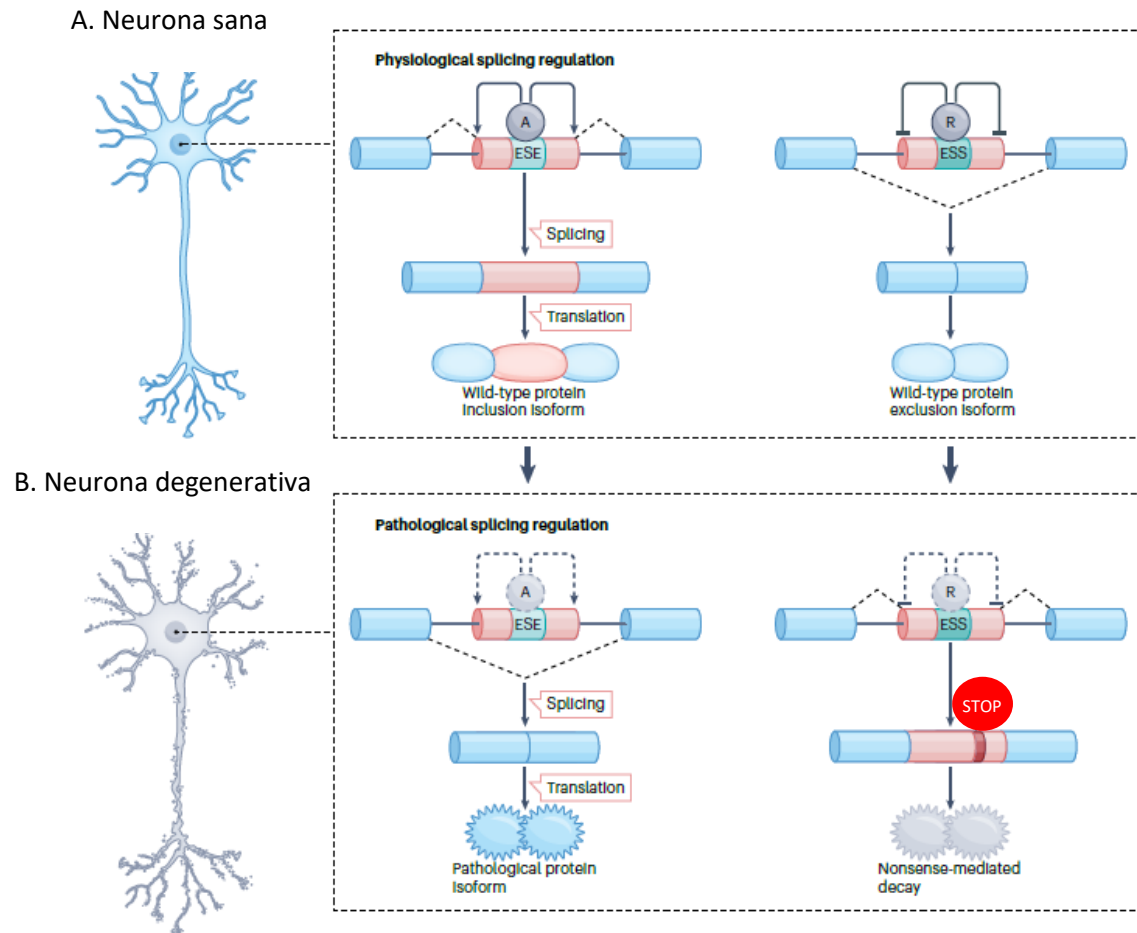


Figura 9. Desregulación del procesamiento alternativo en enfermedades neurodegenerativas. A: En neuronas sanas, la expresión de activadores (A) y represores (R) de splicing regula patrones fisiológicos de procesamiento alternativo. **B.** La inhibición de activadores y represores de splicing puede generar variantes patológicas. Imagen adaptada de (Nikom & Zheng, 2023).

1.7.2. Procesamiento alternativo en enfermedades neurodegenerativas

En las dos últimas décadas se ha puesto de manifiesto la importancia de la regulación del procesamiento alternativo en procesos como la neurogénesis, la formación de axones y la maduración de las sinapsis, así como su implicación en las enfermedades neurodegenerativas. Este avance ha impulsado un crecimiento significativo en el desarrollo de estrategias terapéuticas orientadas a corregir eventos anómalos de procesamiento alternativo a través del uso de oligonucleótidos antisentido (Hales et al., 2014).

1.7.3. Procesamiento alternativo en la Esclerosis Múltiple

El procesamiento alternativo del ARN ha emergido como un mecanismo clave en la EM, no solo por su impacto en la diversidad de isoformas, sino también por su potencial para modular respuestas inmunitarias implicadas en la patogenia de la enfermedad. Alteraciones en el empalme pueden modificar funciones celulares esenciales, contribuir a la inflamación y alterar la homeostasis del sistema inmunitario.

Un ejemplo bien caracterizado es el del gen del receptor de IL7 (*IL7R*). El exón 6 codifica el dominio transmembrana de la proteína, por lo que su inclusión genera una isoforma unida a membrana, mientras que su omisión produce una isoforma soluble (sIL7R), asociada a la patogenia de la EM (Lundström et al., 2013). En esta misma línea, se ha identificado a DDX39B como un factor *trans* que regula la inclusión del exón 6. La pérdida de DDX39B en células T CD4+ reduce dicha inclusión y aumenta los niveles de sIL7R, estableciendo un vínculo funcional con mecanismos autoinmunes de la enfermedad (Galarza-Muñoz et al., 2022; Galarza-Muñoz et al., 2017). Posteriormente, el mismo grupo demostró que DDX39B también influye en la expresión de FOXP3, regulador clave de las células T reguladoras (T_{reg}). Su inhibición disminuye la expresión de FOXP3 y favorece perfiles inmunoefectores, lo que subraya el papel central de este factor en enfermedades autoinmunes (Hirano et al., 2023).

De forma complementaria, se han descrito cambios en el empalme de genes implicados en mecanismos inflamatorios, como gasdermina B (*GSDMB*). En pacientes con EMRR se observó un desequilibrio de isoformas con respecto a controles sanos (Cardamone et al., 2017). *GSDMB* presenta un patrón complejo de omisión de los exones 6 y 7, modulado por el polimorfismo rs11078928, que favorece la generación de isoformas alternativas: transcritos que carecen de los exones 5 a 8, que carecen del exón 6 o transcritos con todos los exones. Mientras que en individuos sanos el genotipo condiciona la proporción de isoformas, en pacientes con EMRR, esta regulación depende menos del polimorfismo y sugiere una alteración global en los mecanismos de empalme. Esta disociación entre genotipo y perfil de isoformas coincide con lo observado en otros genes, como *PRKCA* y *NFAT5*, lo que apunta a una posible “firma” característica de la enfermedad.

Además de estos genes, se han identificado alteraciones en miembros de la superfamilia del receptor de TNF (*TNFRSF*) (Gregory et al., 2012), el receptor del factor estimulador de colonias (*CSF1R*) (Spurlock et al., 2015) y la subunidad 2 del receptor de interferones tipo I (*IFNAR2*) (Órpez-Zafra et al., 2017). Un ejemplo ilustrativo es el polimorfismo *rs1800693* en *TNFRSF1A*, cuyo alelo G promueve el salto del exón 6 y genera una isoforma soluble capaz de bloquear la señalización del TNF- α , un mecanismo potencialmente relevante en la desregulación inmunitaria observada en la EM (Gregory et al., 2012).

Estudios de RNA-seq han revelado que cerca del 20 % de los genes transcritos en pacientes con EMRR presentaban pérdida de exones o retención de intrones. Entre los cambios más destacados se encontró la menor abundancia de los exones 8 y 9 en *NFATC1*, la pérdida de los exones 1–11 en *CSF1R* y la retención de intrones en transcritos de la proteína básica de mielina (MBP). La validación por qPCR confirmó estas alteraciones, lo que sugiere la existencia de un patrón extendido de desregulación del splicing en la enfermedad (Spurlock et al., 2015).

Finalmente, varios trabajos de nuestro grupo han profundizado en el papel del procesamiento alternativo en la señalización del interferón. La subunidad IFNAR2 presenta una isoforma soluble (sIFNAR2) generada por splicing alternativo. Observamos que pacientes con EM sin tratamiento mostraban niveles inferiores de sIFNAR2, en comparación con sujetos sanos (Órpez-Zafra et al., 2015) y con pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (Órpez-Zafra et al., 2017). Además, demostramos las propiedades inmunomoduladoras y antivirales de la isoforma recombinante r-sIFNAR2 (Hurtado-Guerrero et al., 2020). Posteriormente, identificamos que el tratamiento con IFN β incrementa la producción de sIFNAR2, y que niveles elevados podrían asociarse a menor eficacia terapéutica, lo que sugiere su utilidad como biomarcador de respuesta al tratamiento (Aliaga-Gaspar et al., 2021). En estudios adicionales de nuestro grupo sobre *TRAIL* y sus receptores, encontramos que el IFN β modula el empalme de estas moléculas y que ciertos perfiles basales de expresión predicen la respuesta clínica (C. López-Gómez et al., 2016). En conjunto, estos hallazgos refuerzan la relevancia del procesamiento alternativo como modulador clave de la actividad inmunitaria y de la respuesta al tratamiento en la EM.

1.7.4. Biotipos

Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) es un navegador genómico diseñado para el análisis de genomas de vertebrados, que facilita la investigación en áreas como la genómica comparativa, la evolución, la variación genética y la regulación transcripcional. Una de sus funciones clave es la anotación de los transcritos generados por procesamiento alternativo del ARN. Para ello, Ensembl clasifica los transcritos en distintos biotipos, que reflejan tanto la función biológica como el origen del ARN. Esta clasificación resulta esencial para interpretar la diversidad funcional del transcriptoma y para distinguir entre isoformas codificantes, no codificantes, y otras variantes transcripcionales (Tabla 2).

Tabla 2. Biotipos de las isoformas de procesamiento alternativo del ARN

Biotipo de splicing	CP	NP	Descripción funcional
Exón saltado (SE, del inglés <i>skipping exon</i>)	✓	✓	Puede generar o eliminar dominios funcionales de proteínas, o introducir desplazamientos del marco de lectura que den lugar a transcritos no funcionales.
Retención de intrón (RI)	✗ / ✓	✓	Suele generar transcritos no codificantes (con codones de parada prematuros), pero puede ser codificante en contextos celulares específicos.
Sitio alternativo de 5'	✓	✓	Puede cambiar el marco de lectura o generar variantes proteicas con extremos N-terminales diferentes.
Sitio alternativo de 3'	✓	✓	Afecta el extremo C-terminal de la proteína, o la inclusión de secuencias UTR.
Exones mutuamente excluyentes	✓	✗	Genera isoformas proteicas exclusivas con diferencias funcionales relevantes.
Exón interno alternativo	✓	✓	Introduce pequeñas variaciones estructurales en proteínas o UTRs.
Splicing alternativo de UTRs (5'-UTR / 3'-UTR)	✗	✓	No afecta la proteína, pero regula la traducción, localización y estabilidad del ARNm.
Exón inicial alternativo	✓	✓	Cambia el sitio de inicio de la transcripción y potencialmente el codón de inicio (AUG), afectando la secuencia proteica.
Exón terminal alternativo	✓	✓	Puede modificar la cola 3' del transcripto (3'-UTR) y generar proteínas con extremos diferentes.
Secuencia codificante no definida (CDS ND)	✗	✓	Transcrito alternativo de un gen del que no puede definirse una secuencia codificante
Pendiente de confirmación	✓	✓	Transcrito identificado por evidencia incompleta pendiente de validación experimental

experimental (del
inglés *to be
experimentally
confirmed*, TEC)

Nonsense
mediated decay
(NMD)

✗

✓

Transcrito sujeto a degradación mediada por
codones de parada prematuros

CP: codificantes de proteína; NP: no codificantes de proteína

1.8. Desarrollo de biomarcadores

A pesar de los avances en el diagnóstico y manejo de la EM existen importantes limitaciones clínicas debido a la heterogeneidad de la enfermedad y a la falta de biomarcadores específicos que permitan un diagnóstico certero y una caracterización precisa de sus diferentes formas clínicas (Klotz et al., 2025). Existe una necesidad real de identificar biomarcadores más sensibles y específicos que no sólo faciliten el diagnóstico temprano, sino que también permitan predecir la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (Chase Huizar et al., 2020). En este contexto, las tecnologías ómicas, como la genómica, la proteómica, la transcriptómica o la metabolómica, han demostrado un gran potencial al ofrecer una visión integral de los mecanismos moleculares subyacentes a la EM (Rispoli et al., 2021; Yang et al., 2024a), revelar firmas moleculares entre los grupos de estudio (Lorena et al., 2023) e identificar nuevas dianas terapéuticas (Yang et al., 2021).

El modelo clásico de desarrollo de biomarcadores sigue un diseño escalonado o triangular (Geyer et al., 2017). Comienza con una fase de descubrimiento inicial, basada en estudios ómicos a gran escala, los cuales permiten identificar moléculas candidatas, generando datos amplios e imparciales que orienten los análisis dirigidos posteriores. Para que estas moléculas candidatas puedan convertirse en biomarcadores con capacidad de traslación a la práctica clínica, es necesaria la validación en cohortes más amplias y la estandarización de métodos analíticos (Del Boccio et al., 2016). Por tanto, el desarrollo de nuevos biomarcadores mediante enfoques ómicos que se aborda en esta tesis doctoral es una oportunidad no sólo para profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares de la EM, sino también para contribuir al diseño de

Introducción

herramientas diagnósticas y de actividad clínica más precisas, que contribuyan al manejo de la enfermedad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La EM es una enfermedad neuroinflamatoria crónica y heterogénea, cuyo diagnóstico y seguimiento clínico se basa actualmente en criterios clínico-radiológicos que pueden ser insuficientes para un diagnóstico temprano, una estratificación precisa o una evaluación dinámica de la actividad de la enfermedad. Esta limitación subraya la necesidad urgente de identificar biomarcadores moleculares fiables que permitan:

- distinguir con mayor precisión a los pacientes con EM de aquellos con otras enfermedades neurológicas inflamatorias y de individuos sanos,
- predecir el curso clínico,
- y monitorizar la actividad inflamatoria en las distintas formas clínicas

En este contexto, las tecnologías -ómicas de alto rendimiento, a nivel de proteína y de expresión de genes, ofrecen herramientas potentes para descubrir nuevos biomarcadores en sangre periférica, que es una fuente accesible y mínimamente invasiva.

2.1. Hipótesis

Existen perfiles moleculares diferenciales, tanto a nivel proteómico como transcriptómico, en la sangre periférica de los pacientes con EM, que permiten identificar biomarcadores con capacidad diagnóstica y pronóstica, así como para monitorizar la actividad de la enfermedad. Estos biomarcadores permiten discriminar entre pacientes con EM, controles sanos y otras enfermedades neurológicas inflamatorias, así como entre las distintas formas clínicas de EM.

2.2. Objetivo general

Identificar y validar biomarcadores proteicos y de expresión génica que permitan:

- diferenciar a los pacientes con EM de controles sanos y de sujetos con otras enfermedades neurológicas inflamatorias y
- detectar actividad de la enfermedad en sus distintas formas clínicas (EMRR, EMSP y EMPP).

2.2.1. Objetivos específicos

Proteómica de alto rendimiento (UHPLC- HRMS)

OBJETIVO I. Caracterización cualitativa y cuantitativa del proteoma sérico mediante UHPLC- HRMS para:

OBJETIVO I.a. Seleccionar proteínas candidatas a biomarcadores diagnósticos que discriminen entre pacientes con EM y controles sanos.

OBJETIVO I.b. Identificar proteínas asociadas a la actividad de la enfermedad en los diferentes cursos clínicos (EMRR, EMSP y EMPP).

OBJETIVO II. Validar las proteínas con mayor poder discriminativo en una cohorte independiente mediante enzoinmunoensayos cuantitativos.

Transcriptómica de alto rendimiento (RNA-seq)

OBJETIVO III. Analizar, mediante RNA-seq en sangre periférica, los patrones de procesamiento alternativo del ARN para:

OBJETIVO III.a. Seleccionar isoformas transcriptómicas candidatas a biomarcadores diagnósticos (EM vs controles sanos).

OBJETIVO III.b. Detectar isoformas asociadas a la actividad de la enfermedad en las diferentes formas clínicas (EMRR, EMSP y EMPP).

OBJETIVO III.c. Seleccionar isoformas transcriptómicas candidatas a biomarcadores de diagnóstico diferencial (EM vs otras enfermedades neurológicas inflamatorias).

OBJETIVO IV. Validar las isoformas con mayor valor discriminativo en una cohorte independiente mediante PCR a tiempo real (qPCR).

Con esta sucesión de análisis-validación dual se aspira a generar un panel integrado de biomarcadores útiles para el diagnóstico y actividad de la EM.

MATERIAL Y MÉTODOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

El presente estudio se desarrollará en dos fases secuenciales: una fase exploratoria y una fase de validación, con el objetivo de identificar y confirmar biomarcadores moleculares potenciales para el diagnóstico o la evaluación de la actividad de la EM (Figura 10).

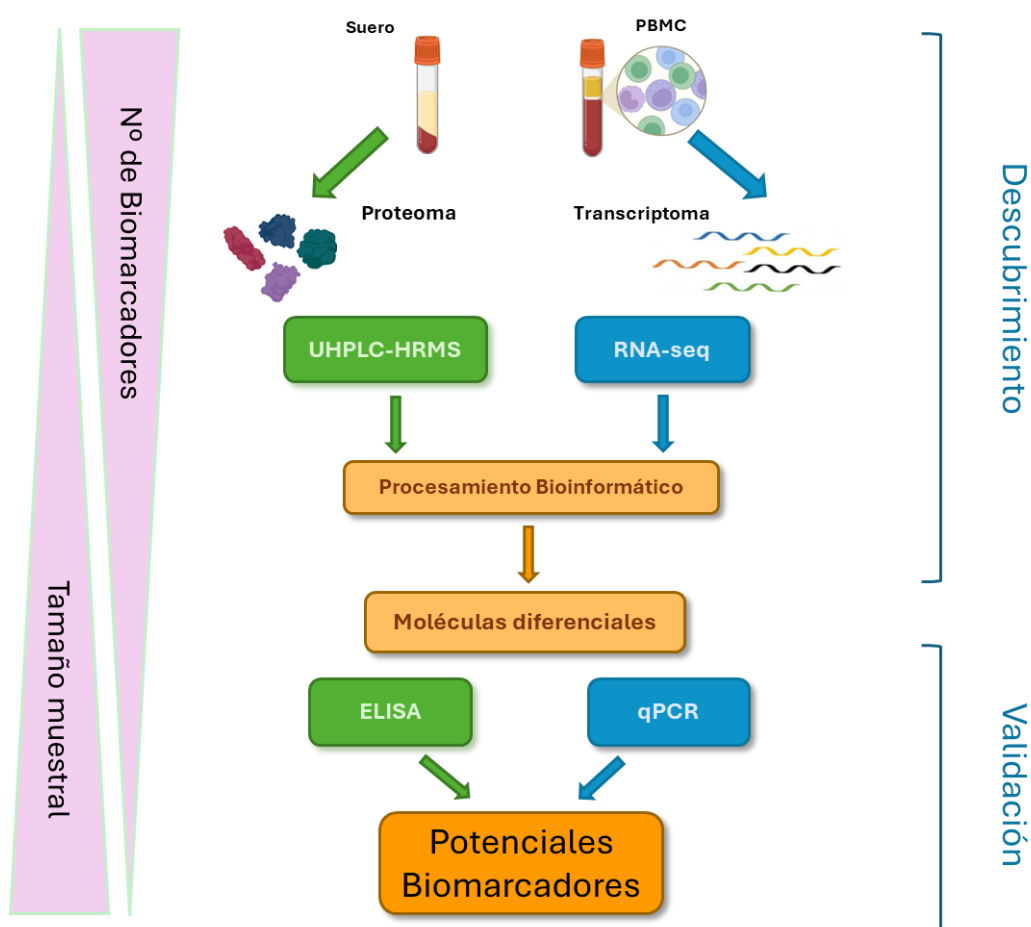


Figura 10. Flujo de trabajo del proceso de descubrimiento de biomarcadores. El desarrollo de biomarcadores se desarrolla a través de dos etapas importantes: fase de descubrimiento para identificar isoformas solubles de proteínas en suero y para evaluar la expresión génica de transcritos que codifican isoformas de citoquinas y de sus receptores; seguida de fase de validación específica para proteínas solubles y transcritos. El análisis proteómico se representa en verde y el transcriptómico en azul. En naranja se muestran los procesos comunes en ambos enfoques “ómicos”. Tal como indican los embudos, el número de biomarcadores potenciales disminuye a lo largo de todo el proceso, mientras que aumenta el tamaño muestral sobre el que se testan. Figura modificada de Del Boccio et al., 2016.

3.1.1. Fase exploratoria o de descubrimiento

Se han llevado a cabo dos estudios transversales independientes por técnicas -ómicas con el propósito de evaluar:

- La expresión de proteínas solubles en suero mediante proteómica
- La expresión génica de isoformas generadas por ensamblaje o procesamiento alternativo del ARN, correspondientes a citoquinas, sus receptores, quimiocinas y proteínas implicadas en vías de señalización intracelular en PBMC, mediante transcriptómica

Ambos estudios se han realizado con el fin de identificar patrones de expresión diferencial que puedan servir como biomarcadores diagnósticos o de actividad de la enfermedad en pacientes con EM.

3.1.2. Fase de validación

Esta fase ha consistido en dos estudios transversales independientes, orientados a confirmar los hallazgos obtenidos en la fase exploratoria:

- a) Validación proteica: las proteínas solubles con una abundancia diferencial en el suero de los diferentes grupos de estudio en la fase exploratoria fueron reevaluadas mediante enzoinmunoanálisis (ELISA) en una muestra independiente de sujetos, con el objetivo de determinar su utilidad como biomarcadores diagnósticos o de actividad de la enfermedad.
- b) Validación génica: la expresión génica de algunas de las isoformas de procesamiento alternativo del ARN detectadas en la fase exploratoria fue analizadas por PCR a tiempo real (qPCR) a fin de confirmar su valor como posibles biomarcadores diagnósticos o de actividad en EM.

3.2. Selección de sujetos

El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación de Málaga. Todos los participantes fueron informados sobre el propósito de la investigación y proporcionaron su consentimiento informado por escrito.

Para la realización de todas las fases de este trabajo, se seleccionaron pacientes diagnosticados de EM que cumplieran los siguientes criterios:

- Ser mayor de edad
- Estar diagnosticado de Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida (EMCD) de acuerdo con los criterios de McDonald de 2010 (Polman et al., 2011)
- Encontrarse en fase de remisión clínica
- No estar tratados en el momento de la evaluación clínica y recogida de muestras, bien por ser pacientes naïve sin exposición previa a inmunomoduladores o inmunosupresores, o bien porque hubieran completado el periodo de lavado recomendado tras la suspensión de un tratamiento previo, antes de iniciar una nueva terapia

Los pacientes se reclutaron a través de las Unidades de Esclerosis Múltiple de los siguientes centros:

- Hospital Regional Universitario de Málaga (HRUM)
- Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla
- Hospital Universitario Torrecárdenas de Almería

Los criterios de inclusión para los sujetos controles fueron:

- Ser mayor de edad
- Ser donantes de sangre sanos del nodo del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA) en Málaga
- No presentar antecedentes familiares o personales de enfermedades autoinmunes o neurológicas

La selección de sujetos para cada fase del estudio (exploratoria o de valoración), se detalla a continuación.

En la fase exploratoria del estudio proteómico, se incluyeron un total de 18 pacientes con EMCD: (7 con EMRR, 7 con EMSP y 4 con EMPP). Adicionalmente, se reclutaron 6 sujetos como grupo control sano (HC), que cumplieran los criterios de inclusión. La validación de los resultados del análisis proteómico se llevó a cabo en 80 pacientes con EMCD, así como en 21 HC. Dentro del grupo EM se incluyeron 38 pacientes con EMRR, 21 con EMSP y 21 con EMPP. Los pacientes con EMRR incluidos en el estudio se reclutaron en las tres provincias de Andalucía mencionadas.

Por otro lado, en la muestra exploratoria del estudio transcriptómico, se incluyeron 19 pacientes con EMCD procedentes del servicio de neurología del HRUM: 7 con EMRR, 7 con EMSP y 5 con EMPP. Se reclutaron también 6 controles (HC) y 2 pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OIND): uno con Miastenia gravis AchR+ y otro con Síndrome de cerebelo subagudo de probable origen paraneoplásico. La muestra de validación estaba compuesta por un total de 155 sujetos: 106 pacientes con EMCD (49 EMRR, 38 EMSP y 19 EMPP), 7 pacientes con OIND (2 vasculitis del SNC, 3 síndromes de Guillain-Barré, 1 Miastenia gravis y 1 Síndrome cerebeloso subagudo) procedentes del servicio de neurología del HRUM, y 42 HC proporcionados por el biobanco del SSPA.

3.3. Procesamiento de las muestras

3.3.1. Análisis de proteínas. Obtención de suero

En la fase exploratoria, a cada sujeto se le extrajeron 5 ml de sangre en un tubo con gel separador (BD Vacutainer® SST™) para la obtención de suero. Una vez extraídas las muestras en la Unidad de Esclerosis Múltiple del HRUM, los tubos con gel separador se colocaron en posición vertical en una gradilla para permitir la coagulación durante 30 minutos desde el momento de la extracción. Posteriormente, se transportaron en condiciones de refrigeración (con acumuladores de frío) al laboratorio de investigación del Hospital Civil, perteneciente al HRUM, siendo procesadas en un plazo de 1 a 2 horas tras su extracción. En primer lugar, las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente (TA) a 1500–2000 g durante 10 minutos. Tras la centrifugación, el suero fue cuidadosamente aspirado con micropipeta, evitando el contacto con el gel de la interfase, y transferido en alícuotas de 0,5 mL a viales de polipropileno. Estos viales fueron correctamente cerrados, etiquetados y almacenados en congeladores a -80 °C hasta su envío al Servicio de Proteómica de la Universidad de Málaga.

En la fase de validación, la diferencia con el epígrafe anterior es que a cada sujeto se le extrajeron 10 ml de sangre en dos tubos con gel separador y que, posteriormente, los tubos se transportaron en condiciones de refrigeración al laboratorio de investigación del HRUM o a los nodos del Biobanco del SSPA en Sevilla y Almería.

En los respectivos laboratorios, las muestras se centrifugaron siguiendo el procedimiento previamente descrito, con la diferencia de que los viales congelados se

enviaron al laboratorio de Investigación del Hospital Civil de Málaga para la realización de los ELISAs correspondientes.

3.3.2. Análisis de transcritos. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

El proceso para aislar PBMCs a partir de muestras de sangre venosa periférica se basa en la centrifugación por gradiente de densidad, permitiendo una separación de los componentes celulares que facilita el aislamiento y recuperación de las células mononucleadas (linfocitos y monocitos).

En la fase exploratoria, a cada sujeto se le extrajeron 9 ml de sangre en un tubo Vacuette® tratado con ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic Acid*). La muestra de sangre se diluyó en solución salina fisiológica en una proporción 1:1 y fue dispensada lentamente sobre 4 mL de solución de Lymphoprep™ (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Germany) en tubos de 15 mL, evitando que se mezclaran ambas fases. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 600 x g durante 25 minutos a TA, permitiendo que la centrifuga se detuviera sin la acción del freno. Tras esta centrifugación se forman 4 fases de abajo a arriba (pellet de eritrocitos y granulocitos, solución Lymphoprep, un halo con la fracción mononuclear, y una capa superior de plasma). Se recogió el halo con las PBMC con ayuda de una pipeta Pasteur, evitando aspirar la solución de Ficoll, y se transfirió a un nuevo tubo de centrifugación, lavando las células dos veces con suero fisiológico, mediante centrifugación a TA durante 10 minutos, la primera vez a 300 x g y posteriormente a 150 x g, para eliminar las plaquetas. Se decantó el sobrenadante y al botón o pellet celular se le añadieron 500 µL de medio RPMI (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) con 40% de SBF (suero bovino fetal, Gibco™ life technologies), retirando una alícuota de 5 µL para recuento celular y determinación de viabilidad. Se ajustaron las PBMC a una concentración de 6 millones/mL en medio RPMI con 40% de SBF y se transfirieron 500 µL de esta suspensión a criotubos preenfriados, añadiendo 500 µL de RPMI con 40% de SBF y 20% de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) gota a gota a cada criotubo. Se colocaron los crioviales en un recipiente de congelación MrFrosty (Thermo Fisher) diseñado para lograr una velocidad de refrigeración gradual de - 1 °C/min y se llevaron

a un congelador de -80°C durante un mínimo de 12h y un máximo de 3 días. Finalmente, los crioviales se transfirieron al contenedor de nitrógeno líquido, para su almacenamiento a largo plazo.

En la fase de validación, a cada sujeto se le extrajeron 18 ml de sangre venosa periférica en dos tubos Vacuette® tratados con EDTA. El aislamiento de PBMC y su criopreservación se realizó del mismo modo que en la fase exploratoria.

3.4. OBJETIVO I. Análisis proteómico. Fase exploratoria

3.4.1. Análisis proteómico en suero de pacientes con EM y controles sanos

Como se ha mencionado, se realizó una fase de descubrimiento para identificar proteínas diferencialmente abundantes en el suero de pacientes con EM y controles sanos, utilizando técnicas proteómicas basadas en cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), que se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga. En la Figura 11 se representa el diagrama de flujo de la fase exploratoria del análisis proteómico.

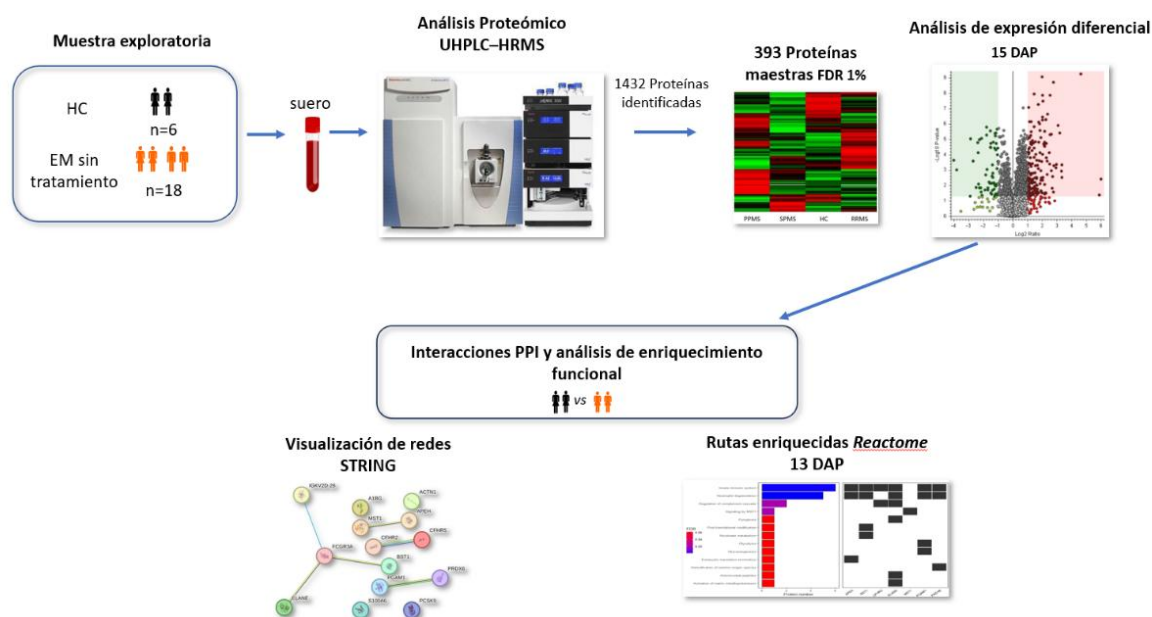


Figura 11. Diagrama de flujo de la fase exploratoria del análisis proteómico

3.4.1.a. Preparación de muestras. Digestión proteica en gel y extracción de péptidos

El primer paso para la preparación de las muestras fue la eliminación de las 12 proteínas más abundantes en el suero, utilizando el kit Pierce™ Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Columns, de Thermo Fisher (Life Technologies Europe, Bleiswijk, Netherlands) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los eluidos de las columnas se concentraron en una centrífuga de vacío hasta obtener un volumen final de 45 µL de muestra depurada.

Una vez concentradas, las muestras fueron sometidas a proteólisis asistida por gel, quedando atrapadas en una matriz de poliacrilamida mediante la adición de persulfato amónico y tetrametiletilendiamina (TEMED). Tras la polimerización, llevada a cabo durante aproximadamente 20 minutos, los geles resultantes se cortaron en fragmentos y se trataron con una solución de acetonitrilo (ACN) al 50 % v/v en bicarbonato amónico 25 mM.

A continuación, los fragmentos de gel se deshidrataron con ACN, se redujeron con ditioneitol (DTT) 10 mM en bicarbonato amónico 50 mM durante 30 minutos a 56 °C, y se alquilizaron con α-yodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM durante 20 minutos a TA. Posteriormente, se llevó a cabo la digestión enzimática mediante tripsina (Promega, Madison, WI, EE. UU.) incubando a 37 °C durante toda la noche. Los péptidos generados fueron extraídos de los fragmentos de gel mediante incubación con ACN al 50 % más 0,1 % de ácido fórmico (AF) durante 30 minutos a TA. Las muestras se secaron en un concentrador de vacío SpeedVac™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para eliminar los restos de ACN y bicarbonato amónico, y posteriormente se reconstituyeron en 50 µL de solución acuosa con 0,1 % de AF.

Las muestras reconstituidas se sometieron a sonicación durante 3 minutos y se centrifugaron a 14 000 g durante 5 minutos. Finalmente, se cuantificaron mediante espectrofotometría UV-visible con un NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific), y se ajustaron con 0,1 % de AF para normalizar todas las muestras a una concentración proteica uniforme de 0,5 µg/µL, previa a su transferencia a los viales de inyección.

3.4.1.b. Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

Tras la normalización a una misma concentración, las muestras se inyectaron en un sistema UHPLC Easy nLC 1200 acoplado a un espectrómetro de masas híbrido de trampa lineal cuadrupolo Orbitrap Q-Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific). Las versiones del software utilizadas para la adquisición de datos y operación fueron Tune 2.9 y Xcalibur 4.1.31.9. Los disolventes de HPLC utilizados fueron los siguientes: el disolvente A consistía en un 0.1% de AF en agua, y el disolvente B consistía en un 0.1% de AF en 80% de ACN. Las muestras se cargaron automáticamente en una precolumna trampa (*Acclaim PepMap 100*, 75 μm x 2 cm, C18, 3 μm , 100 Å, Thermo Fisher Scientific) a un flujo de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ y se eluyeron en una columna analítica de 50 cm (*PepMap RSLC C18*, 2 μm , 100 Å, 75 μm x 50 cm, ThermoFisher Scientific). Los péptidos se eluyeron de la columna analítica durante 120 minutos con un gradiente que varió desde un 2 a un 20% de disolvente B, seguido de un gradiente de 20 al 35% de disolvente B durante 30 minutos, y finalmente, un 95% de disolvente B durante 15 minutos antes de la reequilibración al 2% de disolvente B, a un flujo constante de 300 nL/min. Se realizaron escaneos MS1 en un rango de 300 a 1750 m/z a una resolución de 120.000. En un modo de adquisición dependiente de datos, se seleccionaron los 20 iones precursores más intensos de entre todos los iones precursores con carga de +2 a +5, dentro de una ventana de 1.2 m/z, y se fragmentaron para obtener los espectros correspondientes de MS/MS (MS2). Los iones de fragmentación se generaron en una celda de disociación por colisión de alta energía (HCD) y se detectaron en un analizador de masas Orbitrap a una resolución de 30.000. La exclusión dinámica de los iones seleccionados fue de 30 segundos. El tiempo de acumulación máximo permitido en modo MS y MS2 fue de 50 ms. Para evitar la saturación de la trampa de iones, se utilizó el control automático de ganancia y se configuró en 3×10^6 iones y 10^5 iones para el escaneo completo de MS y MS2, respectivamente. Se analizaron tres réplicas técnicas de cada muestra.

Para la calibración externa del instrumento, previo al análisis de las muestras, se utilizó la solución de calibración de iones positivos LTQ Velos ESI (Pierce). Adicionalmente, se realizó una calibración interna utilizando la señal del ion polisiloxano presente en el aire ambiental, con una relación m/z de 445.120024. Para controlar posibles efectos por

lotes, todas las muestras se analizaron en una única corrida analítica. Además, se aleatorizó el orden de inyección de las muestras para minimizar sesgos analíticos sistemáticos. Se inyectaron muestras en blanco entre cada muestra para monitorear la estabilidad del instrumento y detectar posibles arrastres.

3.4.1.c. Análisis de datos para la identificación de proteínas

Los espectros de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se analizaron utilizando el motor de búsqueda SEQUEST® HT, integrado en el software Proteome Discoverer™ 2.2 (Thermo Fisher Scientific), comparándolos con la versión canónica de la base de datos SwissProt para *Homo sapiens*. Los parámetros de búsqueda incluyeron una tolerancia de masa de 10 ppm para los iones precursores, 0.02 Da para los iones fragmento y se permitió hasta dos sitios de corte no reconocidos por la tripsina.

Las coincidencias entre los espectros peptídicos y las asignaciones de proteínas se validaron con el algoritmo Percolator®, empleando una estrategia *target-decoy* (con péptidos target y péptidos señuelo) y aplicando un estricto umbral del 1 % de tasa de falsos positivos (FDR, por sus siglas en inglés: *False Discovery Rate*). Los péptidos identificados se agruparon en proteínas siguiendo el principio de parsimonia, y sólo se consideraron para el análisis aquellas proteínas principales que presentaran al menos dos secuencias únicas de péptidos detectados en las tres réplicas biológicas de esa condición experimental.

Como control de calidad, se incluyó un estándar de digestión de albúmina sérica bovina de grado LC-MS (Thermo Scientific™ Pierce™) a lo largo de todo el procedimiento.

3.4.1.d. Cuantificación relativa sin marcaje (Label-free quantification) para el análisis de expresión diferencial

La cuantificación sin marcaje se implementó utilizando la función Minora de Proteome Discoverer™ 2.2. Las abundancias de las proteínas se basaron en la intensidad de los iones precursores. Se aplicó una normalización de las muestras utilizando la "Cantidad Total de Péptidos", y se llevó a cabo una prueba de hipótesis utilizando un ANOVA basado en la abundancia de cada proteína o péptidos individual. Sólo se consideraron significativamente desreguladas aquellas proteínas con un valor de $p < 0.05$ en el ANOVA

y una ratio de abundancia superior a 2:1 o inferior a 1:2 en la comparación entre casos y controles.

Para representar los datos gráficamente, se utilizó un valor normalizado correspondiente al $\log_2$ fold change (FC) entre muestras. En este contexto, una diferencia de 1 unidad en el valor $\log_2$ FC indica que la proteína tiene una abundancia dos veces mayor en una muestra con respecto a la otra.

3.4.2. Análisis de redes y vías de señalización en el análisis proteómico

Se realizó un análisis bioinformático con el conjunto de proteínas que presentaron una abundancia diferencial. Se creó la red de interacción proteína-proteína utilizando la base de datos STRING (<https://string-db.org>), que asigna a cada nodo la representación de una proteína y las conexiones entre ellas indican interacciones físicas y/o funcionales (Szkarczyk et al., 2021). Se mantuvieron los parámetros establecidos por defecto de STRING, incluido el *minimum required interaction score* de 0,4, es decir, que el análisis se basó en un umbral que permite incluir interacciones de confianza media, y debido al elevado número de nodos no conectados, se decidió agregar una capa de un máximo de 20 "interactores" a la red de interacción.

Se efectuó el análisis de agrupación o formación de clústeres en la red de interactores utilizando la herramienta MCODE de Cytoscape (versión 3.10.1). Esta aplicación divide la red de proteínas en grupos o clusters con una alta densidad de conexiones. Se mantuvieron los parámetros establecidos por defecto. Finalmente, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías utilizando la herramienta bioinformática *Reactome* (<http://https://reactome.org/PathwayBrowser>; versión 87 lanzada el 06/12/2023). El valor de significación vino determinado por $p < 0,05$ y estableciendo la corrección de Benjamini-Hochberg para evitar falsos positivos (FDR). El coeficiente de agrupamiento o clustering de un vértice vino determinado por la proporción entre los enlaces conectados con sus vecinos y el número de enlaces existentes; y el coeficiente de clustering promedio de la red, como la media de los coeficientes de agrupamiento de todos los vértices de esa red (Watts & Strogatz, 1998).

3.5. OBJETIVO II. Fase de validación del análisis proteómico sérico.

Enzimoimmunoensayos

Aquellas proteínas séricas que mostraron una abundancia diferencial entre pacientes con EM y HC o entre pacientes con diferentes formas clínicas en la fase exploratoria se reevaluaron mediante ELISA en una muestra independiente de sujetos, siguiendo el siguiente flujograma (Figura 12):

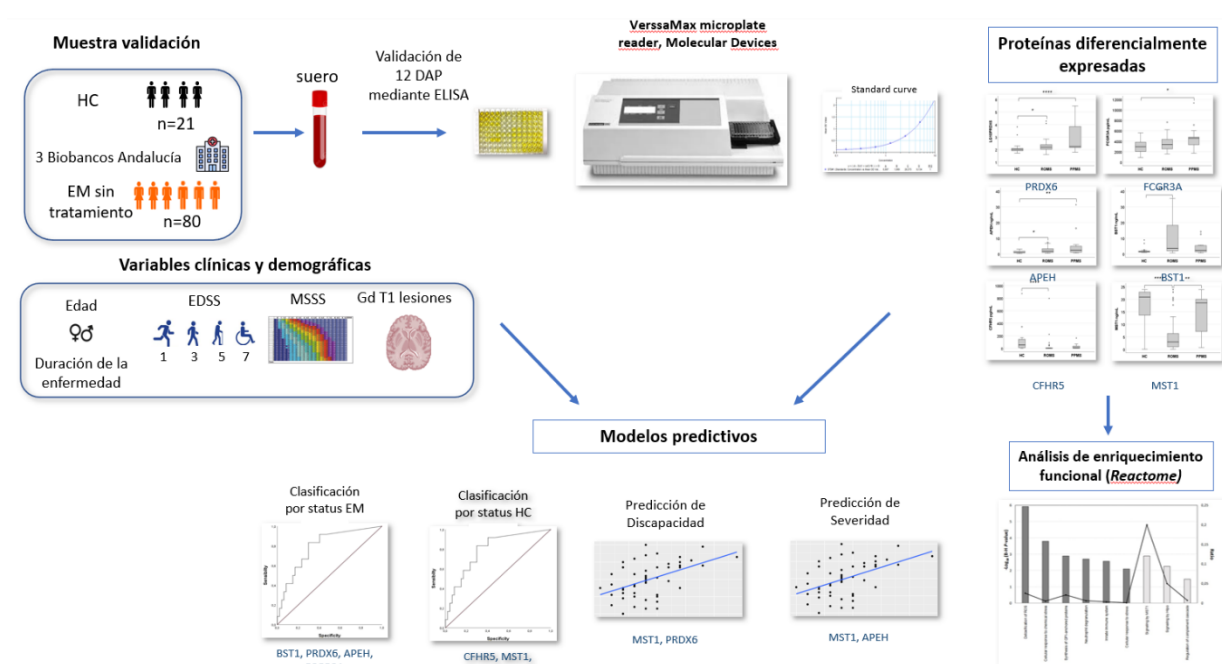


Figura 12.. Diagrama de flujo de la fase de validación del análisis proteómico.

3.5.1. Validación por Enzimoimmunoensayos

Los niveles de cada una de las proteínas se midieron con los kits comerciales de ELISA indicados en la Tabla 3:

Tabla 3. Proteínas determinadas por enzimoimmunoensayos tipo sándwich comerciales

Proteína	Fabricante
- actinina 1 alfa (ACTN1), - fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM1), - proteína de unión al calcio S100 A6 (S100A6), - peroxirredoxina 6 (PRDX6),	Anticuerpos-Online GmbH (Aquisgrán, Alemania);

• proteína 2 relacionada con el factor H del complemento (CFHR2), • proteína 5 relacionada con el factor H del complemento (CFHR5), • antígeno de células estromales de médula ósea 1 (BST1), • N-acilaminoacil-péptido hidrolasa (APEH), • elastasa expresada en neutrófilos (ELANE), • fragmento Fc de la IgG IIIa del Receptor CD16a de baja afinidad (FCGR3A)	
• proproteína convertasa subtilisina/kexina humana tipo 9 (PCSK9)	R&D Systems, Bio-technie, (Minneapolis, MN, EE. UU.)
• proteína estimulante de macrófagos (MST1)	Boster, PicoKine (Pleasanton, CA, EE. UU.)

3.5.1.a. Preparación de reactivos y muestras para enzimoimmunoanálisis

Se descongeló una alícuota de cada muestra y se centrifugó para eliminar precipitados. En los casos en los que los fabricantes lo recomendaran, se diluyeron las muestras de suero a la dilución sugerida.

Tras llevar todos los componentes del kit y las muestras a TA (18–25 °C), se reconstituyeron los estándares de cada kit con la cantidad especificada de diluyente de estándar. Se dejaron reposar durante 10 minutos a TA y se agitaron suavemente. Se realizaron 6 diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ para establecer los diferentes puntos de la curva estándar. Se utilizó un octavo tubo con solo diluyente de estándar como blanco.

Las concentraciones utilizadas para elaborar la curva estándar en la determinación de cada proteína se establecieron siguiendo las indicaciones del fabricante y se recogen en la Tabla suplementaria 1. Posteriormente, se reconstituyeron y diluyeron el resto de los reactivos, soluciones de lavado y sustratos de cada kit según las indicaciones del fabricante.

3.5.1.b. Principio de los enzimoimmunoanálisis

Brevemente, las placas de ELISA proporcionadas en los kits venían precubiertas con un anticuerpo monoclonal específico (*anticuerpo de captura*) para cada proteína a determinar. Primero se añadieron los estándares en duplicado y las muestras de suero a los pocillos correspondientes, seguido de un anticuerpo específico para la proteína a

determinar conjugado con biotina (*anticuerpo de detección*). A continuación, se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pocillo y se procedió a su incubación. Posteriormente, se agregó la solución de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina); sólo aquellos pocillos que contenían la proteína diana, el anticuerpo conjugado con biotina y la estreptavidina conjugada con HRP presentaban un cambio de color. La reacción enzima-sustrato se detuvo con la adición de una solución de ácido sulfúrico, y el cambio de color se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. La excepción fue el kit para PCSK9 en el que el anticuerpo de detección venía conjugado directamente a HRP y se añadía una solución sustrato de peróxido de hidrógeno estabilizado + TMB, parando la reacción de color con Ácido Sulfúrico 2N.

La Tabla 4 presenta las características analíticas proporcionadas por el fabricante para los kits de ELISA empleados. El rango de detección se define como el intervalo de concentraciones del analito que el ensayo puede cuantificar de manera precisa, reproducible y lineal. Este intervalo está delimitado por los límites inferior y superior de cuantificación. La Sensibilidad se define como la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el ensayo, distinguiéndose significativamente del ruido de fondo o del blanco.

Tabla 4. Rangos de detección de los kits ELISA. Rangos de detección, sensibilidades analíticas, números de lote y coeficientes de variación (CV) intra-ensayo e inter-ensayo de los kits ELISA utilizados en la fase de validación y proporcionados por el fabricante.

Proteína	Rango de detección	Sensibilidad	Lote	CV intra ensayo	CV inter ensayo	Dilución usada
ACTN1	0,31 - 20 ng/ml	0,115 ng/ml	L210322284	<10%	<12%	1/1
PGAM1	0,31 - 20 ng/ml	0,125 ng/ml	L210322253	<10%	<12%	1/1
S100A6	78 - 5000 pg/ml	30 pg/ml	L210322253	<10%	<12%	1/1
PRDX6	15,625 - 1000 pg/ml	9,375 pg/ml	H1911G120, H1911G038E	<8%	<10%	1/2
CFHR2	0,313 - 20 ng/ml	0,188 ng/ml	H4862G120, H4862G038E	<8%	<10%	1/2
CFHR5	31,25 - 2000 pg/ml	14,8 pg/ml	L210621439	<10%	<12%	1/1
BST1	0,156 - 10 ng/ml	0,094 ng/ml	H2142G120, H2142G038E	<8%	<10%	1/2
APEH	0,156 - 10 ng/ml	0,094 ng/ml	H1573G038E	<8%	<10%	1/2
ELANE	0,313 - 20 ng/ml	0,188 ng/ml	H0750G038E	<8%	<10%	1/2
FCGR3A	31,2 - 2000 pg/ml	13,5 pg/ml	L211126630	<10%	<12%	1/2

Material y Métodos

PCSK9	0,030 - 0,219 ng/ml	0,096 ng/ml	P266024, P277732	<7%	<6%	1/20
MST1	156 - 10000 pg/ml	<10 pg/ml	4651739330	<8%	<10%	1/2

Todas las muestras se midieron por duplicado siguiendo los protocolos específicos proporcionados por cada fabricante. La concentración de proteína se determinó mediante interpolación de la densidad óptica de las muestras en una curva estándar mediante el software SoftMax® Pro (Molecular Devices).



Figura 13. Ejemplo del resultado de un ELISA para la cuantificación de PCSK9 en muestras de suero. Las dos primeras columnas representan la curva estándar, y las restantes muestran los niveles de la proteína en suero de sujetos sanos y pacientes con EM.

3.5.1.c. Análisis estadístico de la fase de validación

Se realizó un análisis de potencia post-hoc utilizando el paquete `pwr` del software R (versión 4.5.0), considerando un modelo ANOVA unidireccional balanceado. La *f* de Cohen fue calculada a partir de los datos de abundancia de proteínas. Este análisis permitió confirmar que la muestra de validación contaba con una potencia estadística adecuada para detectar diferencias significativas en la abundancia de proteínas entre los grupos definidos. Reveló una potencia estadística de 0,86 para detectar diferencias en la abundancia de proteínas con un tamaño del efecto grande (*f* de Cohen = 0,4), empleando un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Para determinar las diferencias significativas de concentración entre las distintas formas clínicas de EM y controles, se realizaron pruebas post hoc de comparaciones por pares tras análisis global por el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (KW). Las diferencias encontradas se ajustaron para pruebas múltiples con la corrección de Bonferroni (p_{adj}).

Para evaluar la capacidad discriminativa de las proteínas con abundancia diferencial como posibles biomarcadores, se realizó un análisis de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic). A través del cálculo del área bajo la curva (AUC), este análisis permite

estimar de forma cuantitativa la capacidad de una determinada isoforma para diferenciar entre sujetos enfermos y sanos, facilitando la identificación de puntos de corte óptimos y la valoración conjunta de sensibilidad y especificidad.

Las asociaciones entre los niveles de proteína y variables clínicas, como la duración de la enfermedad, la tasa anual de recaídas, o la puntuación en escalas EDSS y MSSS en el momento de la inclusión, fueron evaluadas mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Posteriormente, se aplicó un modelo de regresión lineal multivariable, ajustado por sexo y edad al momento del muestreo. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos resultados que presentaron un valor de p ajustado (FDR) < 0,05.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS (versión 28.0.1.1). Las representaciones gráficas fueron generadas empleando SPSS o la librería ReactomePA (versión 1.5) en R (versión 4.3.3).

3.6. OBJETIVO III. Análisis transcriptómico. Fase exploratoria de la expresión génica de isoformas de procesamiento alternativo del ARN

Para la realización del análisis transcriptómico se siguió el flujograma detallado en la Figura 14.

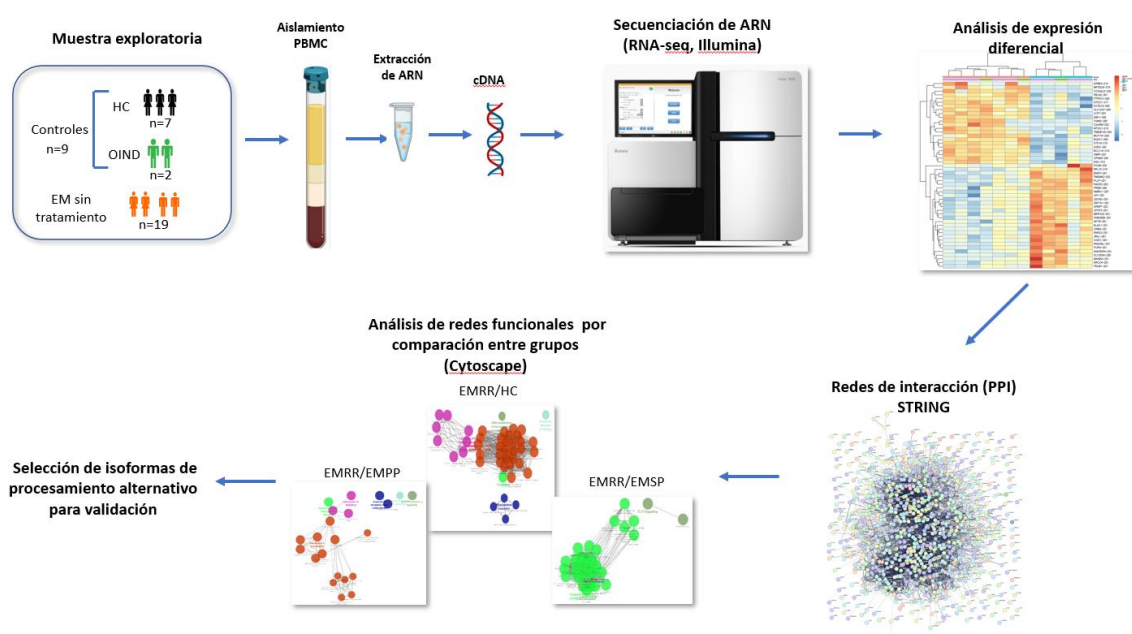


Figura 14. Diagrama de flujo de la fase exploratoria del análisis transcriptómico

3.6.1. Descongelación de las PBMC. Extracción y cuantificación de ARN total

Tras descongelar las PBMC criopreservadas tal y como se describe en el apartado 3.3. se procedió a la extracción del ARN total.

Materiales necesarios:

- Reactivo de lisis QIAzol (Qiagen, Hilden, Alemania), solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe las membranas plasmáticas y nucleares de las PBMC, desnaturaliza las proteínas y disocia los complejos macromoleculares
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- Cloroformo (Sigma-Aldrich)
- Etanol para biología molecular $\geq 99.8\%$ (Sigma-Aldrich)
- Centrífuga de mesa (Macrotronic-BL J.P. Selecta, Barcelona, España)
- Microcentrífuga MiniSpin plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)
- Columnas RNeasy y tubos de colección (Qiagen)
- Agua libre de nucleasas (agua DEPC, dietilpirocarbonato) (Sigma-Aldrich)

Los criotubos se transfirieron a un baño termostático a 37°C hasta justo antes de la descongelación del último cristal de hielo, momento en el que el contenido se transfirió a un tubo de centrifugación de 15 ml, añadiendo 9 ml de PBS y centrifugando a 300 x g, durante 10 minutos, a TA. Se decantó el sobrenadante y al precipitado se le añadieron 700 μ L de reactivo de lisis QIAzol, transfiriendo el lisado a un tubo nuevo de 2 mL. La mezcla se homogeneizó cuidadosamente con una pipeta y se dejó reposar a TA durante 5 minutos, permitiendo la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.

Brevemente, tras la adición de 200 μ L de cloroformo, la suspensión se agitó por inversión durante 15 segundos para posteriormente ser centrifugada (13000 x g, 4°C, 15 minutos), tras lo cual se formaron tres fases: ARN en la fase acuosa superior, ADN en la interfase y las proteínas y lípidos en la fase orgánica inferior. En ese momento, se procedió a extraer el ARN con el RNeasy Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transfirió cuidadosamente la fase acuosa superior a un tubo nuevo y se le añadió un volumen de etanol para crear las condiciones de unión adecuadas para todas las moléculas de ARN de más de 200 nucleótidos (nt), mezclando suavemente por pipeteo. Después, se transfirió un máximo de 700 μ L de la mezcla a la columna de

centrifugación RNeasy Mini colocada sobre un tubo de recolección, y se centrifugó (8000 × g, TA, 15 segundos), descartando el eluyente y conservando la columna. Si el volumen de la muestra excedía los 700 µl, se centrifugaron alícuotas sucesivas en la misma columna de centrifugación RNeasy, desechando el eluyente de cada centrifugación. Posteriormente, se añadieron 700 µl del Buffer RW1 a la columna sobre el tubo de recolección y se centrifugó ($\geq 8000 \times g$, 15 segundos) para lavar la membrana de la columna. Se desechó el eluyente en el tubo de recolección, se volvió a colocar la columna sobre el mismo tubo y se dispensaron 500 µl del Buffer RPE a la misma columna para su centrifugación ($\geq 8000 \times g$, 15 segundos), desechando el eluyente recogido en el tubo de recolección. Este proceso permite que el ARN total se adhiera a la membrana de sílice y los contaminantes como el fenol se eliminen mediante los lavados de la columna. Inmediatamente, se añadieron otros 500 µl del Buffer RPE a la misma columna para proceder al secado de la membrana de la columna mediante centrifugación ($\geq 8000 \times g$, 2 minutos), a fin de eliminar el etanol residual. Por último, se colocó la columna en un tubo de recolección limpio libre de RNasas, se centrifugó a la máxima velocidad durante 1 minuto para eliminar cualquier resto de Buffer RPE residual, tras lo cual la columna se colocó en un nuevo tubo de recolección. Se añadieron 30-50 µl de agua libre de nucleasas (agua DEPC) a la columna y se centrifugó ($\geq 8000 \times g$, 1 minuto) para eluir el ARN.

Una vez extraído el ARN, se midió la concentración y pureza del ARN total en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Se evaluó la ratio 260/280 nm, para conocer el grado de pureza del ARN y la ratio 260/230 para detectar la presencia de contaminantes como carbohidratos, fenol y otros alcoholes. Se midió también la integridad del ARN con Qubit™ RNA IQ Assay Kits (Invitrogen), mediante un índice IQ que se establece en una escala de 1 a 10. Los valores más bajos de IQ indican que la muestra se compone mayoritariamente de ARN de pequeño tamaño, indicativo de un proceso de degradación, mientras que los valores altos de IQ indican que la muestra se compone mayoritariamente de ARN de gran tamaño o estructurado (ARNm, ARNt y ARNr). Los valores de IQ obtenidos tras analizar las muestras procesadas estaban entre 7 y 8,7.

3.6.2. Preparación y secuenciación de librerías de mRNA-seq

En esta fase exploratoria se llevó a cabo un análisis de secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-seq), con una profundidad de 64 millones de lecturas, lo que permitió la detección de isoformas generadas por procesamiento alternativo del ARN. Las muestras de ARN fueron enviadas congeladas al Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG) en Barcelona, donde se procedió a la secuenciación de las librerías de ARN utilizando un sistema HiSeq 2000, basado en la tecnología Illumina.

Para la preparación de las librerías, se determinó previamente la calidad y cantidad total del ARN utilizando el ensayo Qubit® RNA HS (Life Technologies) y el ensayo RNA 6000 Nano en un Bioanalizador Agilent 2100.

Las librerías de RNA-seq se prepararon siguiendo el protocolo del kit *TruSeq® Stranded mRNA LT* (Illumina). En resumen, se utilizaron 500 ng de ARN total por muestra, a partir de los cuales se enriqueció la fracción de ARNm mediante captura de colas poli-A, seguida de fragmentación controlada. La síntesis de la segunda cadena de ADNc se realizó en presencia de dUTP, lo que permitió conservar la direccionalidad de las lecturas. El ADNc bicatenario con extremos romos fue posteriormente adenilado en el extremo 3' y se le ligaron adaptadores compatibles con la plataforma Illumina, que incluían índices duales e identificadores moleculares únicos (UMIs) proporcionados por Integrated DNA Technologies (IDT).

El producto de ligación fue amplificado mediante 15 ciclos de PCR, y la calidad de las librerías resultantes se evaluó utilizando el ensayo *DNA 7500* en un sistema *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies).

La secuenciación de las librerías se llevó a cabo en un sistema *HiSeq 4000* (Illumina), utilizando el kit *HiSeq 4000 SBS* con una configuración de lectura pareada de 2 × 101 pares de bases. El análisis de imágenes, la llamada de bases y la evaluación de la calidad de las lecturas se realizaron mediante el software *Real Time Analysis* (RTA, versión 2.7.7) del fabricante.

3.6.3. Análisis de expresión génica diferencial

Las secuencias obtenidas mediante RNA-seq fueron alineadas al genoma humano de referencia (GRCh38) utilizando el alineador STAR (versión 2.5.3a; Dobin et al., 2013) aplicando los parámetros recomendados por el consorcio ENCODE. La cuantificación de genes e isoformas se realizó con RSEM, versión 1.3.0 (B. Li & Dewey, 2011), empleando parámetros predeterminados y la anotación GENCODE v35.

El análisis de expresión génica diferencial se llevó a cabo mediante el paquete DESeq2, versión 1.18, (Love et al., 2014) en R. Para la visualización de los datos, los recuentos fueron transformados logarítmicamente.

El FC representa el cambio relativo en la expresión génica entre dos condiciones experimentales, calculado como el cociente entre los niveles de expresión en la condición 1 y la condición 2. Se consideraron como diferencialmente expresados de forma significativa aquellos genes que presentaron un $FDR < 0,05$ y un cambio en la expresión génica con un Log_2 Fold Change ajustado (*shrunk*) $\geq |0,58|$. Este Log_2 Fold Change ajustado (*shrunk*) es una estimación corregida estadísticamente del cambio en la expresión, diseñada para reducir la variabilidad y el sesgo, especialmente en genes con baja expresión o alta dispersión. Esta técnica de *shrinkage* (encogimiento) suaviza los valores extremos del FC, proporcionando estimaciones más robustas y fiables. Su uso permite minimizar falsos positivos y mejora la interpretación biológica de los resultados.

Los mapas de calor se generaron utilizando el paquete *pheatmap* de R.

3.6.4. Enriquecimiento funcional y análisis de vías de señalización

Una vez recibidos los datos del CNAG y siguiendo el enfoque del análisis proteómico, la red de genes con expresión diferencial se construyó utilizando la herramienta STRING. Primero se analizaron los genes con expresión diferencial en todos los pacientes con EM frente a controles, y luego se analizaron las formas clínicas por separado. Se mantuvieron los parámetros establecidos por defecto.

A continuación, se procedió al análisis de formación de clúster de esta red con la herramienta Cytoscape y utilizando la aplicación MCODE. Esta herramienta segmenta la

red de genes en clúster, agrupados por una densidad de conexión significativa y manteniendo los parámetros establecidos por defecto. Posteriormente, aquellos clústeres con scores más elevadas se analizaron con la aplicación ClueGO, utilizando la base de datos de *Reactome* para determinar las vías de señalización en que podrían estar involucrados los genes. En los resultados se muestran las rutas con un valor de FDR ≤ 0.05 .

3.7. OBJETIVO IV. Fase de validación del análisis transcriptómico por PCR a tiempo real (qPCR)

La secuencia de actividades en la fase de validación del análisis transcriptómico se detalla en la Figura 15.

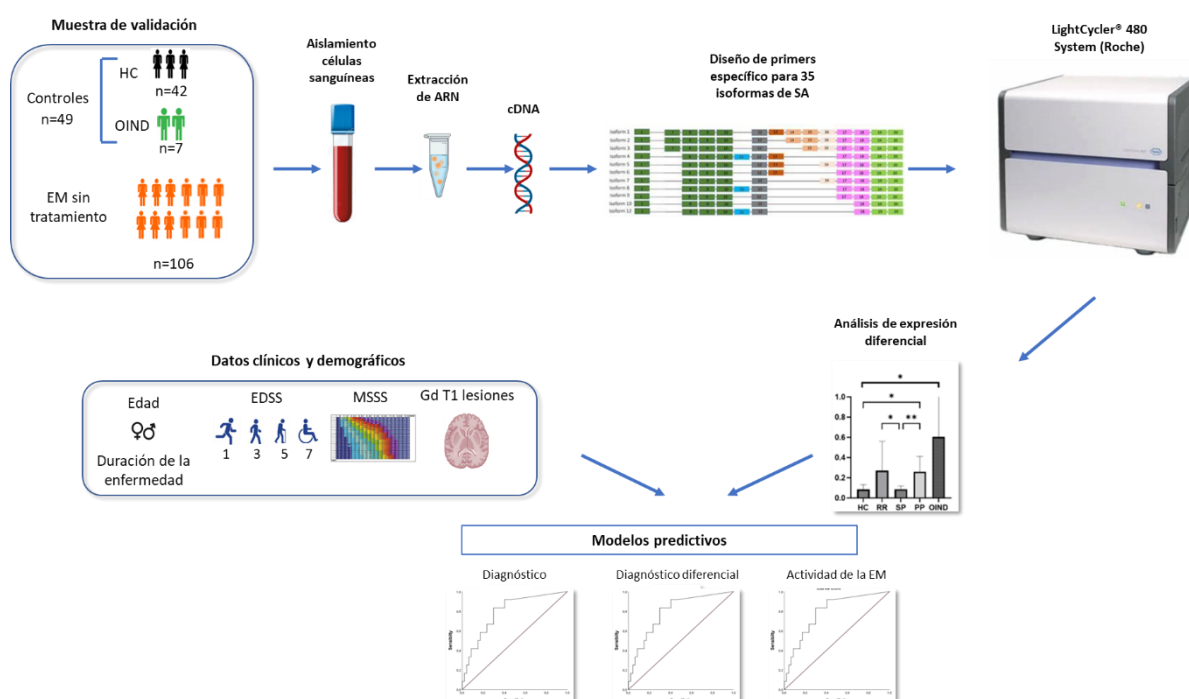


Figura 15. Diagrama de flujo de la fase de validación del análisis transcriptómico.

3.7.1. Obtención de ADN complementario mediante retrotranscripción (RT-PCR)

Tras la descongelación de las PBMC y el aislamiento del ARN, tal y como se ha descrito en el epígrafe 3.6.1, se procedió a su retrotranscripción.

Materiales necesarios: Casas comerciales

- ARN total (purificado, libre de DNasa)
- Transcriptasa reversa MMLV (*del inglés Moloney Murine Leukemia Virus*), (Sigma-Aldrich)
- Random nonamers (secuencias aleatorias de 9 nt usadas como cebadores universales para la síntesis de ADN complementario), (Sigma-Aldrich).
- Mezcla de Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), (10 mM cada uno), (Roche Diagnostics Corporation, Mannheim, Alemania)
- Tampón de reacción 10 × para MMLV
- Inhibidor de ARNasas
- Agua libre de nucleasas (agua DEPC, dietilpirocarbonato)

A continuación, se procedió a la obtención del ADN complementario (ADNc). La retrotranscripción se llevó a cabo en dos pasos: En el primero, para cada muestra se preparó una mezcla con 1 µg de ARN total, 1 µl de random nonamers, y se completó el volumen hasta 10 µl con agua DEPC. Seguidamente, la mezcla se incubó en un termociclador-VERITI (Applied Biosystems) durante 10 minutos a 70 °C, para favorecer la unión de los random nonamers a la cadena de ARN. En el segundo paso, se añadieron a la suspensión anterior 4 µl de la mezcla de dNTPs, 1 µl de Inhibidor de ARNasa, 2 µl de tampón MMLV 10x, 2 µl de agua DEPC y 1 µl de enzima MMLV. Una vez añadidos todos los reactivos, las muestras se incubaron en el termociclador durante 10 minutos a 25°C, la elongación se realizó a 42°C, durante 60 minutos, se inactivó la enzima a 70°C durante 15 minutos, y se finalizó manteniendo las muestras a 4°C.

3.7.2. Selección de biomarcadores y diseño de cebadores

En función de los resultados obtenidos en la fase exploratoria tras los análisis transcriptómicos, se hizo una selección de isoformas de splicing alternativo candidatas a biomarcadores, que fueron validados en la nueva muestra de pacientes por PCR a tiempo real (qPCR).

Un paso crucial en la obtención de resultados fiables mediante qPCR es el diseño de los cebadores específicos para cada secuencia de ADNc. Para identificar y caracterizar las isoformas generadas por procesamiento alternativo, se empleó inicialmente la

plataforma Ensembl (<https://www.ensembl.org>), en la que se buscaron los transcritos de interés, se accedió a sus secuencias y se alinearon con el resto de las isoformas o transcritos del mismo gen con la herramienta "*Transcript comparison*" con el fin de identificar regiones divergentes entre las distintas isoformas del mismo gen. Con esta información, se procedió al diseño de los cebadores exclusivos para cada una de ellas con la herramienta *Primer Blast*, del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Para cada par de cebadores propuesto, se verificó mediante el alineamiento generado por Primer-BLAST que la hibridación ocurriera exclusivamente en la región diferencial seleccionada y que no presentara homología significativa con otras isoformas ni con secuencias no diana del genoma humano.

La selección final de los cebadores se basó en criterios estándar de diseño, incluyendo un contenido de GC adecuado, temperatura de fusión o *melting* (T_m) compatible entre los cebadores de cada par, longitud óptima, ausencia de estructuras secundarias y auto-complementariedad, así como un tamaño de amplicón apropiado para qPCR. Solo se retuvieron aquellos cebadores que cumplieran simultáneamente con todos estos requisitos y que mostraron la máxima especificidad para la isoforma objetivo.

Como criterio principal para la inclusión en la fase de validación se estableció que los cebadores tuvieran una eficiencia de amplificación cercana a 2, y que el producto amplificado presentara un único pico en la curva de *melting*, lo que indicaba una amplificación específica. En casos puntuales, se aceptaron ligeras desviaciones en la eficiencia cuando se trataba de isoformas con especial interés biológico.

3.7.3. Cuantificación relativa de la expresión génica de isoformas de procesamiento alternativo del ARN por PCR a tiempo real

La cuantificación relativa de la expresión génica de las distintas isoformas de procesamiento alternativo a través de qPCR se llevó a cabo utilizando un equipo LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics). Para la reacción, se preparó una mezcla que contenía 2 μ L de ADNc, 0,5 μ L de una mezcla de cebadores forward y reverse (a una concentración final de 10 μ M), y 2,5 μ L de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Biorad,

Hercules, CA, USA) por reacción. Esta mezcla se distribuyó en una placa de 386 pocillos, calculando un excedente equivalente a cinco reacciones adicionales para compensar posibles pérdidas por pipeteo. Finalmente, se dispensaron 5 µL de mezcla en cada pocillo. El protocolo de qPCR consistió en una etapa de:

- preincubación inicial a 95°C durante 5 minutos,
- 45 ciclos
 - desnaturalización a 95°C durante 5 segundos
 - hibridación de cebadores a 60°C durante 5 segundos
 - elongación a 72°C durante 25 segundos

Tras la amplificación se obtuvieron las curvas de *melting* en cada reacción, para confirmar la especificidad de amplificación. Para ello se mantuvo la placa a 65°C durante 1 minuto y luego se elevó la temperatura a 97°C, a una velocidad de 2.5°C/s. Durante esta fase de *melting*, la adquisición de la señal de fluorescencia se hizo de forma continua mientras que, durante los ciclos de amplificación, la señal se adquirió puntualmente al final de cada ciclo.

El fluorocromo SsoFast™ EvaGreen® es un marcador genérico del ADN o ADNc bicatenario que posee una señal indetectable cuando está libre, pero emite fluorescencia una vez que se une al ADN de doble cadena. Este fluorocromo se excita a una longitud de onda de 470±10 nm y la señal es detectada a 510±5 nm. La emisión de fluorescencia generada va aumentando en cada ciclo de la PCR y es proporcional a la cantidad de ADN amplificado. La principal limitación de estos marcadores es que al unirse al total de ácidos nucleídos en la reacción de la PCR, emiten una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son. Para hacer frente a esta situación, se debe realizar un análisis de los resultados en la curva de fusión o curva de *melting*, arriba mencionada. Este análisis permite que los productos no específicos (dímeros de cebadores o cualquier otro producto no buscado como diana) puedan ser discriminados de los amplicones específicos (Ririe et al., 1997).

Cuando la doble cadena de ADNc se desnaturaliza por efecto de la temperatura, la fluorescencia disminuye porque el colorante deja de estar unido al producto de la PCR. El termociclador analiza dónde surge el primer diferencial negativo de la señal de fluorescencia con respecto a la temperatura. Este punto aparece como uno o más picos

que representan las temperaturas a las que se producen los máximos niveles de cambio de la fluorescencia (T_m , del inglés *melting temperature*), y que se corresponden con un producto particular en la PCR. La especificidad de los cebadores se confirmó mediante el análisis de curvas de *melting* verificando la presencia de un único pico de disociación.

La cuantificación de los genes es relativa, es decir, la expresión de los genes diana se relaciona con la expresión de genes constitutivos o de referencia, que se utilizan para normalizar los productos de PCR. Esta normalización se basa en el hecho de que estos genes se expresan de manera constitutiva y su nivel de expresión no debe variar entre diferentes condiciones experimentales, tipos celulares, tratamientos, o estados fisiológicos, entre otros. En nuestro estudio hemos incluido el gen de referencia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GADPH*) en el análisis de todas las isoformas y un segundo gen constitutivo, la enzima conjugadora de la ubiquitina E2 D2 (*UBE2D2*), que ha sido considerado como el gen de referencia de expresión más estable en PBMC de pacientes con EM y HC (Oturai et al., 2016). La utilización de dos genes de referencia mejora la precisión de la normalización.

También se incluyó un calibrador, es decir, una muestra de referencia utilizada para establecer un punto de comparación en la cuantificación relativa de la expresión génica mediante qPCR. En este estudio, empleamos como calibrador un pool de muestras de pacientes sin tratamiento, que se incluyó en todas las placas analizadas. La utilización de este calibrador permitió normalizar los resultados y comparar la expresión de las distintas isoformas entre muestras procesadas en diferentes tandas experimentales.

Para evaluar la reproducibilidad de la técnica de PCR a tiempo real entre distintas placas, se calculó el coeficiente de variación (CV) a partir de los valores de C_t (*cycle threshold*) obtenidos para los genes de referencia *GAPDH* y *UBE2D2* en el calibrador.

Además, siguiendo las recomendaciones de las guías MIQE (Bustin et al., 2025), se analizó la estabilidad de los dos genes de referencia entre los pacientes de EM y los controles sanos mediante un análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los valores medios de C_t por muestra.

3.7.4. Cálculo de la expresión relativa

El cálculo de la expresión relativa se realizó mediante dos métodos: el método 2 delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) y el método E (Pfaffl, 2001).

El **método 2^{-ΔΔCt}** expresa el valor obtenido de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del calibrador, tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{gen constitutivo}} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}} \\ \text{Expresión relativa} &= 2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

Definimos el punto Ct como el ciclo de qPCR en el cual el aumento de fluorescencia, y por tanto de amplificación, supera un umbral y comienza a ser exponencial. El valor de este punto es inversamente proporcional al nivel de expresión del producto.

En el **método E**, los cálculos se basan en la comparación de los valores Ct utilizando la eficiencia (E) de la reacción de PCR como factor de corrección. Este modelo tiene en cuenta la diferencia en eficiencias que puede tener la PCR tanto para los genes en estudio como para los de referencia. La expresión relativa se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{\text{diana}})^{\Delta Ct_{\text{diana}} (\text{calibrador-muestra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}} (\text{calibrador-muestra})}}$$

Donde E_{diana} y E_{ref} son la eficiencia de la reacción de PCR del gen diana (isoforma en este caso) y del gen de referencia, respectivamente. ΔCt_{diana} representa la diferencia entre el Ct del calibrador y el Ct de la muestra para el gen diana, mientras que ΔCt_{ref} es la diferencia entre el Ct del calibrador y el Ct de la muestra para el gen de referencia.

Dado que se utilizaron dos genes de referencia (*GAPDH* y *UBE2D2*), se optó por calcular la expresión relativa mediante la media geométrica de sus expresiones individuales, en lugar de la media aritmética. Esta decisión se basa en la recomendación de Vandesompele y cols. (2002), quienes demostraron que la media geométrica proporciona una normalización más robusta y precisa en análisis de qPCR,

especialmente cuando se emplean múltiples genes de referencia (Vandesompele et al., 2002). La fórmula queda de la siguiente manera:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{\text{diana}})^{\Delta C_t^{\text{diana}}}}{\sqrt{(E_{\text{ref1}})^{\Delta C_t^{\text{ref1}}} \cdot (E_{\text{ref2}})^{\Delta C_t^{\text{ref2}}}}}$$

Donde:

E_{diana} : eficiencia del gen diana

E_{ref1} , E_{ref2} : eficiencias de los genes de referencia

$\Delta C_t^{\text{diana}}$: $C_t^{\text{calibrador}} - C_t^{\text{muestra}}$ para el gen diana

ΔC_t^{ref1} , ΔC_t^{ref2} : ídem para los genes de referencia

Para determinar la expresión relativa de las isoformas por este método, es necesario calcular la E de cada reacción de qPCR. La E de amplificación se define como la fracción de moléculas diana que se duplica en cada ciclo de PCR (Lalam, 2006) y se calcula a partir de la pendiente de la curva estándar obtenida después de amplificar diluciones seriadas del molde de ADN en la qPCR (Pfaffl et al., 2004) de acuerdo con la siguiente fórmula:

E como valor de amplificación por ciclo: $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$

o bien E en porcentaje: $(E - 1) \times 100$

La pendiente se calcula mediante regresión lineal ajustada sobre la transformación logarítmica de los valores de C_t correspondientes a las diluciones seriadas de un ADN molde. Para estimar la E específica de la reacción con el par de cebadores diseñados para cada isoforma, se realizaron las curvas estándares a partir de 7 diluciones seriadas (8 puntos), con 3 réplicas por dilución. En la Figura 16 se muestra un ejemplo representativo de las curvas de amplificación de diluciones seriadas y la curva estándar correspondiente.

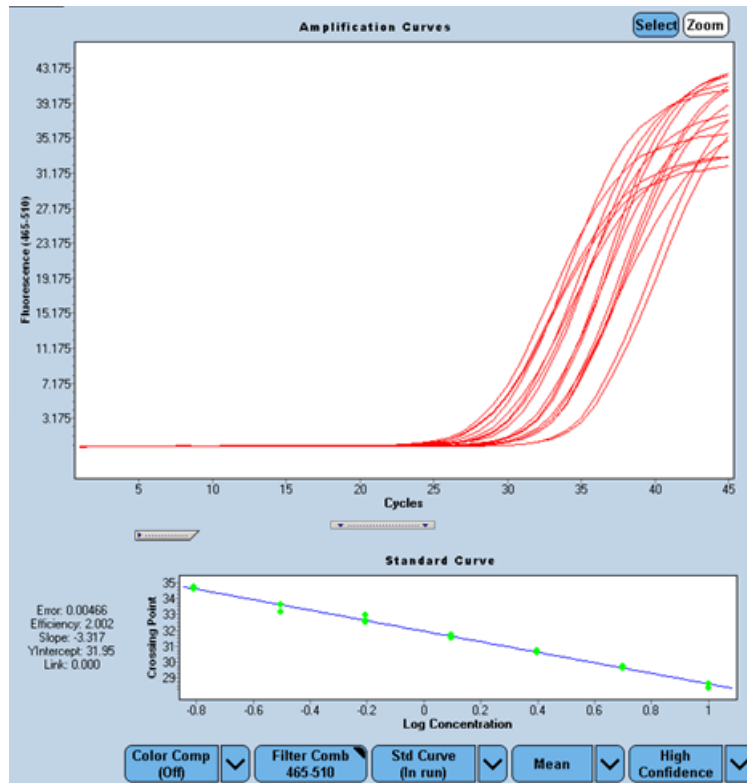


Figura 16. Amplificación de las diluciones seriadas de ADN complementario de la isoforma NF- κ BIA-204 en el cálculo de la eficiencia de la reacción de qPCR, y curva estándar.

Los datos relativos a la comparación de ambos métodos para las diferentes isoformas se detallan en el epígrafe 4.4.3. Optimización de las condiciones experimentales de la PCR a tiempo real.

3.7.5. Análisis estadístico

Las diferencias significativas en la expresión relativa, analizadas mediante ambos métodos ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ o el método E) entre pacientes con EM y controles sanos, se determinaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. De forma análoga a la validación proteómica, las diferencias de expresión entre las distintas formas clínicas de EM, así como entre estas y los controles sanos, se analizaron mediante un test global de Kruskal-Wallis, seguido de pruebas *post hoc* de comparaciones por pares con corrección de Bonferroni. La capacidad discriminativa de los transcritos diferencialmente expresados se examinó mediante análisis de curvas ROC. Para determinar el umbral óptimo de clasificación, se utilizó el índice de Youden (J) definido como:

$$J = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$$

Este índice, propuesto originalmente por Youden (Youden, 1950), cuantifica la capacidad de una prueba para discriminar entre casos y controles maximizando simultáneamente la tasa de verdaderos positivos y minimizando la de falsos positivos. Diversos estudios metodológicos han destacado la utilidad del índice de Youden para la identificación del punto de corte óptimo en el análisis de curvas ROC (Fluss et al., 2005; Ma et al., 2020; Perkins & Schisterman, 2006; Ruopp et al., 2008; Yin & Tian, 2014). En concreto, Yin & Tiang (2014) evidenciaron mediante simulaciones y análisis empíricos que este índice optimiza la tasa de clasificación correcta en el punto de decisión, superando a los métodos basados únicamente en el AUC. Por lo tanto, el punto de corte (cut-off) correspondiente al mayor valor de J se considera el óptimo, al representar el equilibrio más adecuado entre sensibilidad y especificidad para la variable analizada (Hassanzad & Hajian-Tilaki, 2024).

Adicionalmente, para explorar el valor diagnóstico de varias isoformas de forma conjunta, se construyó un modelo combinado mediante regresión logística binaria, donde se introdujeron las isoformas como covariables y el estado clínico como variable dependiente. La probabilidad estimada obtenida del modelo se utilizó para generar una curva ROC combinada, evaluando así su rendimiento global.

Asimismo, se compararon los niveles de expresión entre pacientes con OIND y controles sanos mediante la prueba de Mann-Whitney. Finalmente, para evaluar el potencial de las isoformas de procesamiento alternativo como biomarcadores en el diagnóstico diferencial, se comparó su expresión entre pacientes con EMRR y pacientes con OIND utilizando también el test de Mann-Whitney. Se utilizó el paquete estadístico SPSS 28.0.1.1 (IBM Corp., 2017) para el análisis de datos y GraphPad Prism versión 8.0.2. (GraphPad Software Inc.) para la creación de gráficas.

3.7.6. Análisis de predicción topológica y señalización de isoformas de receptores sobreexpresadas en EM

En el caso de las isoformas de procesamiento alternativo del ARN correspondientes a receptores es importante poder diferenciar entre isoformas solubles y de membrana: funcionales o señuelos. Las primeras pueden actuar como antagonistas naturales,

atrapando ligandos sin activar señalización. Las isoformas de membrana funcionales activan rutas de señalización intracelular tras la unión con su ligando. Por último, las isoformas de membrana señuelo, aunque estén ancladas a la membrana, carecen de dominios intracelulares funcionales. Compiten por el ligando sin activar señalización, actuando como reguladores negativos.

Por ello, se realizó un análisis topológico de las isoformas correspondientes a receptores utilizando el modelo de aprendizaje profundo *Deep Learning Model for Transmembrane Topology Prediction and Classification*, desde la plataforma BioLib, complementado con el algoritmo TMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>). Esta herramienta permite identificar dominios transmembrana, regiones citoplasmáticas y extracelulares, así como predecir la presencia de secuencias señal (péptido señal) responsables del direccionamiento hacia la vía secretora. El término péptido señal se refiere a una secuencia corta ubicada en el extremo N-terminal de la proteína que dirige su entrada al sistema secretor (retículo endoplásmico y Golgi), facilitando su secreción o inserción en la membrana plasmática. La presencia de péptido señal no implica función de señalización en sentido funcional (como activación de vías), sino una función estructural de direccionamiento.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4. RESULTADOS

4.1. OBJETIVO I. Caracterización cualitativa y cuantitativa del proteoma sérico mediante UHPLC- HRMS. Fase exploratoria

4.1.1. Características demográficas y clínicas de los sujetos seleccionados

A partir de los registros médicos se obtuvieron los datos demográficos y clínicos. El inicio de la EM se definió como el primer episodio de disfunción neurológica focal que indicara la presencia de EM en el caso de pacientes con EMRR y EMSP, o como el inicio de síntomas progresivos para aquellos afectados por EMPP. La duración de la enfermedad se calculó como el número de años desde el inicio de los síntomas hasta la última evaluación de la discapacidad. La discapacidad en el momento de la toma de muestras se evaluó utilizando la escala EDSS.

Las características descriptivas de la muestra exploratoria se detallan en la Tabla 5

Tabla 5. Características demográficas y clínicas de los pacientes con EM y sujetos control (HC) incluidos en la fase de descubrimiento del estudio proteómico.

HC n=6		EM n=18	p valor	
Edad (años)	41,5 (30,0-53,5)	49,0 (41,0-54,2)	n.s.	
Mujeres, n (%)	4 (66,6%)	12 (66,6%)	n.s.	
EMRR n=7		EMSP n=7	EMPP n=4	p valor
Edad (años)	43 (30,0-53,5)	54 (49,0-55,0)	51,5 (43,5-55,75)	0,039
Mujeres, n (%)	4 (57,1%)	4 (57,1%)	4 (100%)	n.s.
Tiempo de evolución (años)	2,5 (1,5-19,0)	14,0 (12,0-22,0)	2,5 (1,25-6,0)	0,028
EDSS	1,5 (1,0-2,0)	5,5 (3,5-6,0)	3,75 (2,5-5,75)	0,002

Los datos cuantitativos se presentan como medianas con rangos intercuartílicos. *p*-valor: Se refiere a los valores de *p* obtenidos de las comparaciones entre los controles sanos y los pacientes con EM mediante la prueba de Mann-Whitney (edad) y la prueba de chi-cuadrado (género). Los *p*-valores para las comparaciones entre las tres formas clínicas de la EM se calcularon utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de pruebas de comparación por pares (edad, duración de la enfermedad y EDSS). EMRR: EM Remitente Recurrente, EMSP: EM Secundaria Progresiva, EMPP: EM Primaria Progresiva. Tiempo de evolución: Nº de años desde el inicio de la enfermedad hasta el momento de recolección de la muestra; EDSS: Escala Expandida del Estado de Discapacidad; n.s., no significativo

Las características demográficas de la muestra exploratoria en el momento de la toma de muestras no mostraron diferencias significativas entre los pacientes con EM y los controles, en términos de sexo y edad (Tabla 5). Aunque los pacientes con EMRR fueron, en promedio, más jóvenes que los pacientes con formas progresivas, no se observaron diferencias significativas al hacer las comparaciones por pares. La relación hombre/mujer no presentó diferencias significativas entre los pacientes con EM en las tres formas clínicas. El tiempo de evolución de la enfermedad fue mayor en el grupo de EMSP en comparación con el resto de los pacientes, pero sólo alcanzó diferencias significativas con los pacientes con EMPP ($p_{\text{adj}} = 0,047$). La puntuación en la escala EDSS, como era de esperar, fue significativamente más baja en EMRR que en ambas formas progresivas, mostrándose sólo significativa, tras comparaciones múltiples, con las formas secundarias progresivas ($p_{\text{adj}} = 0,002$).

4.1.2. Estudio proteómico. Fase exploratoria por cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución

Mediante cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-HRMS) y haciendo uso de varias herramientas bioinformáticas, se procedió al análisis del perfil proteómico en suero de pacientes con EM y controles. Se identificaron un total de 1432 proteínas, de las cuales 393 cumplían con los siguientes criterios:

- eran consideradas proteínas "Maestras" dentro de sus respectivos grupos proteicos
- presentaban un límite estricto inferior al 1 % de FDR
- contaban con al menos dos secuencias de péptidos únicas en la proteína

Los experimentos de espectrometría de masas se llevaron a cabo por triplicado, y para evaluar su precisión y reproducibilidad se recogió en un diagrama de cajas la abundancia de cada proteína en cada muestra (en escala $\log_{10}$), normalizada con respecto al total de proteínas. La abundancia se calcula como la suma de las intensidades de cada péptido correspondiente a una proteína.

En la Figura 17, se observa que la mediana de cada grupo está situada aproximadamente en el centro del rango intercuartílico, lo que indica que la distribución de los datos es relativamente simétrica en torno a la mediana. Además, los rangos intercuartílicos son similares entre los grupos, lo que sugiere que la normalización ha sido efectiva y que la variabilidad de las muestras es comparable. Las líneas de los bigotes muestran la dispersión de los datos, y la presencia de algunos valores atípicos es esperable en este tipo de análisis. En conjunto, la figura indica una buena consistencia en la cuantificación de proteínas entre los triplicados de cada grupo.

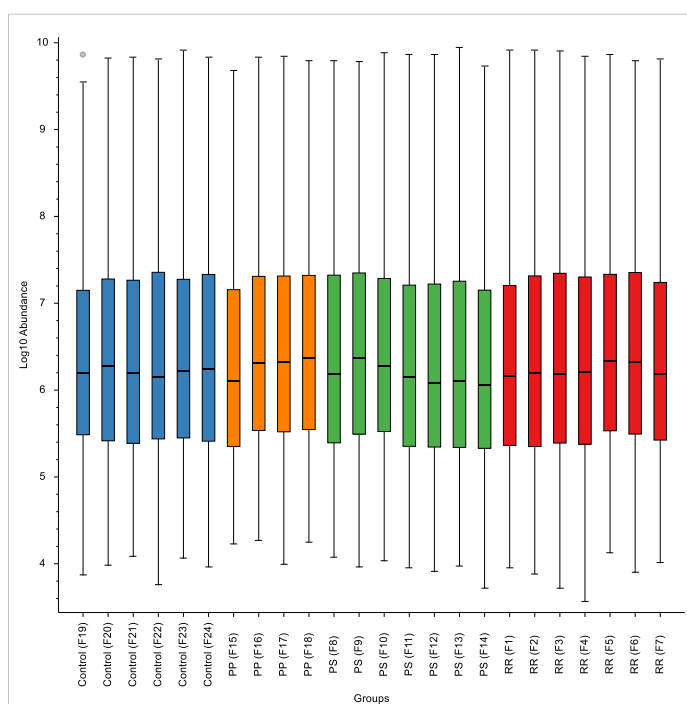


Figura 17. Diagrama de cajas con la abundancia de cada muestra, en escala logarítmica. En azul se muestran los triplicados realizados para las muestras de los sujetos HC, en naranja de los pacientes EMPP, en verde de los pacientes EMSP y en rojo de los pacientes EMRR.

Al comparar la abundancia proteica entre las distintas formas clínicas de la EM y los controles sanos, se observó que, en general, ambos grupos compartían la mayoría de las proteínas detectadas: 372 entre HC y EMPP, 371 entre HC y EMSP y 370 entre HC y EMRR, tal como se muestra en la Figura 18. Sin embargo, se identificaron algunas diferencias específicas:

- **EMPP vs. controles:** Se detectaron 18 proteínas presentes en al menos un paciente con EMPP, pero ausentes en todos los controles. Por el contrario, una

proteína [la xantina deshidrogenasa-oxidasa (XDH)], se encontró en un control, pero no mostró presencia en ningún paciente con EMPP.

- **EMSP vs. controles:** Se observaron 14 proteínas detectables en al menos un paciente con EMSP y ausentes en todos los controles. Adicionalmente, dos proteínas [Filagrina (FLG) y Lipocalina (LCN1)] estaban presentes en un control, pero no fueron detectadas en ninguno de los pacientes con EMSP.
- **EMRR vs. controles:** Se identificaron 10 proteínas detectadas en al menos un paciente con EMRR y ausentes en los controles. En sentido inverso, tres proteínas (XDH, FLG y CPNE3)— se encontraron en al menos un control sano, pero no se detectaron en ningún paciente con EMRR (Figura 18).

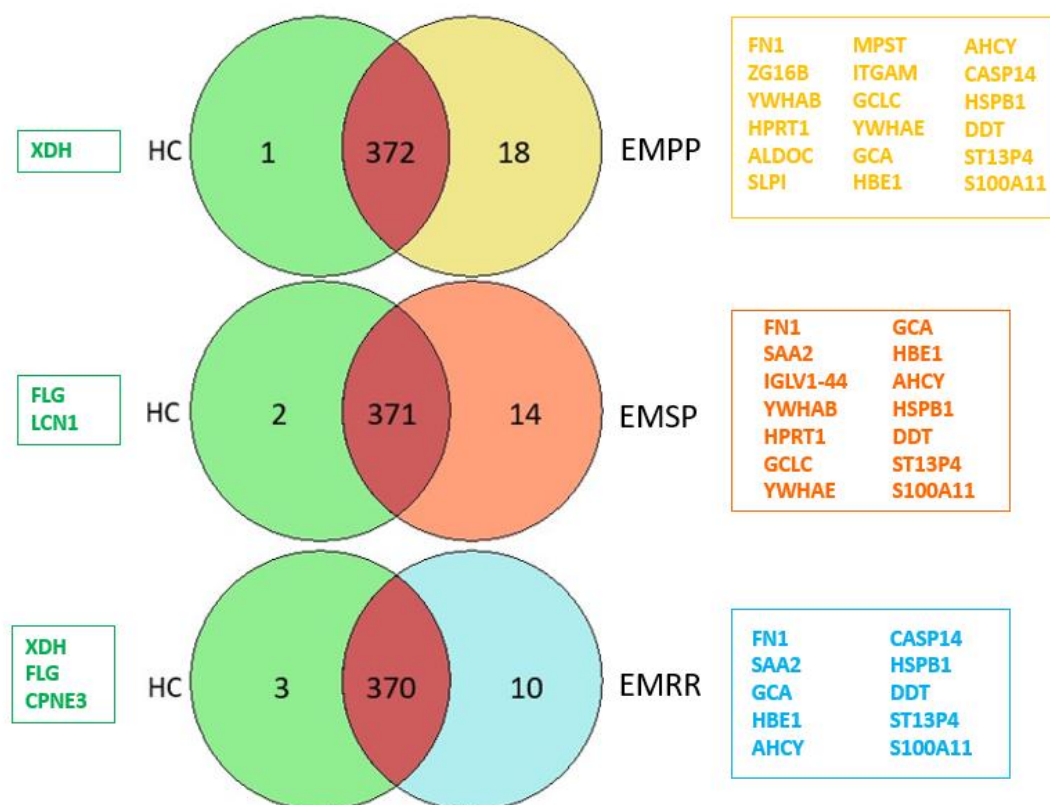


Figura 18. Diagramas de Venn de las proteínas detectadas por cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución, comparando las distintas formas clínicas de EM con los controles sanos. Algunas proteínas se detectaron exclusivamente en al menos un paciente con una forma clínica de EM y estuvieron ausentes en los controles, mientras que otras aparecieron únicamente en al menos un control y estuvieron ausentes en todos los pacientes con la forma clínica de EM correspondiente. Las proteínas exclusivas de pacientes se representan en amarillo (HC vs. EMPP), naranja (HC vs. EMSP) y azul (HC vs. EMRR). Las proteínas exclusivas de controles se muestran en verde. En rojo se muestra el número de proteínas compartidas entre cada par de grupos comparados.

De las proteínas ausentes en los controles, ocho estaban presentes en al menos un paciente de cada una de las formas clínicas; otras seis eran detectadas en al menos un paciente de dos formas clínicas y cinco se detectaron exclusivamente en al menos un paciente con EMPP. Otras 4 proteínas se detectaron en al menos un control y estuvieron ausentes en todos los pacientes con la forma clínica de EM correspondiente con la que se comparaban: XDH apareció en HC, pero no en EMPP ni EMRR; FLG estuvo ausente en EMSP y EMRR; LCN1 no se detectó en EMSP y CPNE3 estuvo ausente en EMRR, tal y como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Número de sujetos de cada grupo en los que se detectaban cada una de las proteínas con diferencias específicas entre las distintas formas clínicas de EM y los controles

	Proteína	HC	EMPP	EMSP	EMRR
FN1	Isoforma 10 de la fibronectina	0	1	2	3
ZG16B	Homólogo B de la prot. 16 del gránulo de zimógeno	0	1	0	0
YWHAB	Proteína 14-3-3 beta/alpha	0	1	1	0
HPRT1	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa	0	3	1	0
ALDOC	Fructosa-bisfosfato aldolasa C	0	1	0	0
SLPI	Antileucoproteinasas	0	1	0	0
MPST	3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa	0	1	0	0
ITGAM	Integrina alpha M	0	1	0	0
GCLC	Subunidad catalítica de la ligasa de glutamato-cisteína	0	1	1	0
YWHAE	Proteína 14-3-3 epsilon	0	1	1	0
GCA	Grancalcina	0	1	1	1
HBE1	Subunidad epsilon de la Hemoglobina	0	2	1	1
AHCY	Adenosilhomocisteinasa	0	1	1	2
CASP14	Caspasa 14	0	2	0	1
HSPB1	Proteína de choque térmico beta-1	0	4	3	2
DDT	D-dopacromo descarboxilasa	0	1	5	3
ST13P4	Proteína putativa FAM10A4	0	2	1	1
S100A11	Proteína S100-A11	0	2	2	4
SAA2	Proteína amiloide sérica A-2	0	0	2	4
IGLV1-44	Inmunoglobulina lambda variable 1-44	0	0	1	0
XDH	Xantina deshidrogenasa-oxidasa	1	0	2	0
FLG	Filagrina	1	1	0	0
LCN1	Lipocalina-1	1	1	0	1
CPNE3	Copina 3	4	2	2	0

Las proteínas exclusivas de pacientes se representan en amarillo (EMPP), naranja (EMSP) y azul (EMRR). Las proteínas exclusivas de controles en las comparaciones con cada una de las formas clínicas se muestran en verde.

Resultados

De las 393 proteínas que superaban los criterios de ser proteínas "Maestras" dentro de sus respectivos grupos proteicos, presentar un FDR <1% y contar con al menos dos secuencias de péptidos únicas en la proteína, 377 eran proteínas comunes para las tres formas clínicas de EM, 6 se detectaban exclusivamente en pacientes con EMPP, y 2 en pacientes con EMSP. Además, se identificaron 2 proteínas compartidas entre EMRR y EMPP, 5 compartidas entre EMPP y EMSP, y 1 compartida entre EMRR y EMSP, como se ilustra en la Figura 19.

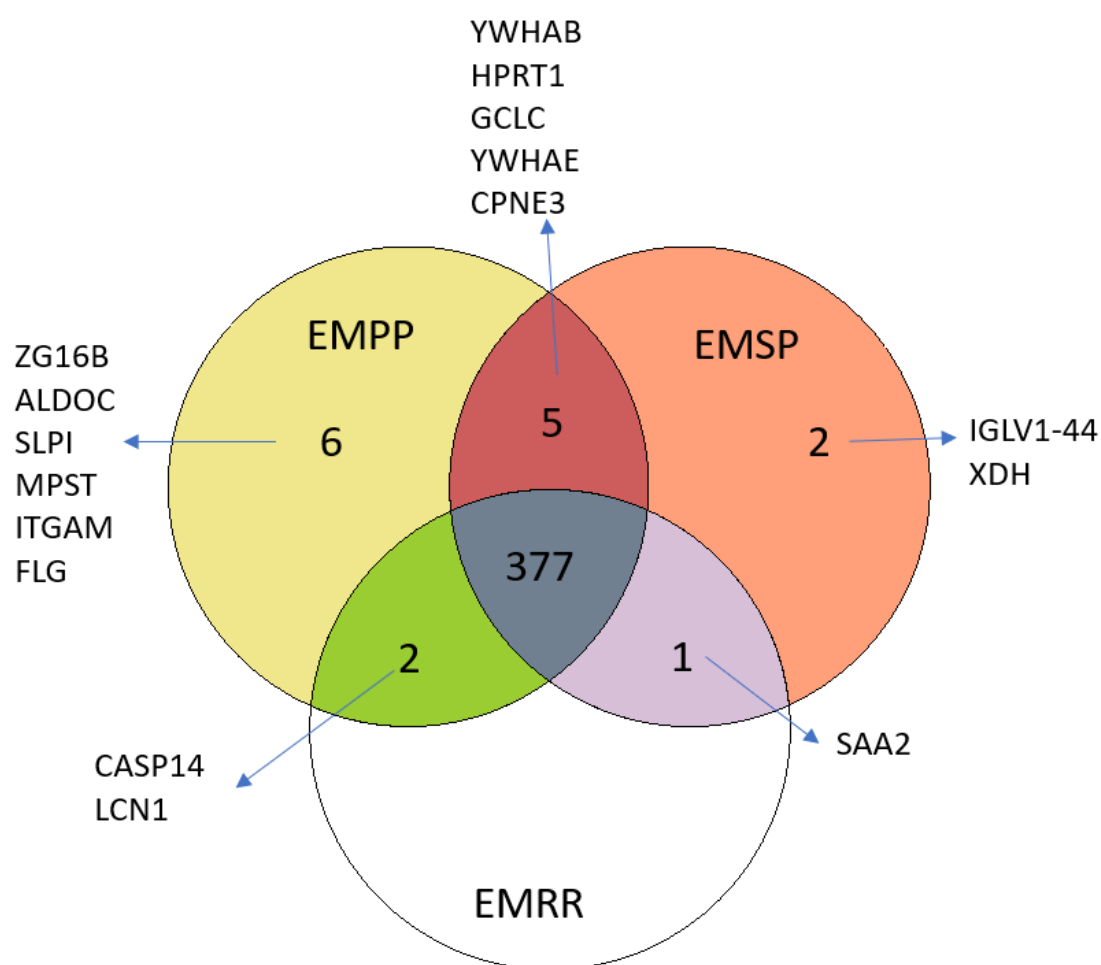


Figura 19. Abundancia diferencial de proteínas detectada por cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución, entre las distintas formas clínicas de EM.

Con el objetivo de identificar patrones en la abundancia de proteínas en los distintos grupos, se generó un mapa de calor o agrupamiento jerárquico (Figura 20). En este análisis, las proteínas se agrupan en función de su similitud en los distintos grupos de

estudio. En la figura, la abundancia relativa de cada proteína se representa mediante una escala de colores, donde el rojo indica una mayor abundancia y el verde una menor abundancia, generando un patrón que facilita la comparación e interpretación de los resultados. Este tipo de visualización permite identificar diferencias en los perfiles de expresión proteica entre los grupos. El análisis revela que cada forma clínica de EM (EMPP, EMSP y EMRR) presenta un patrón característico de expresión proteica, diferenciable tanto de los controles sanos como de las otras formas clínicas de la enfermedad.

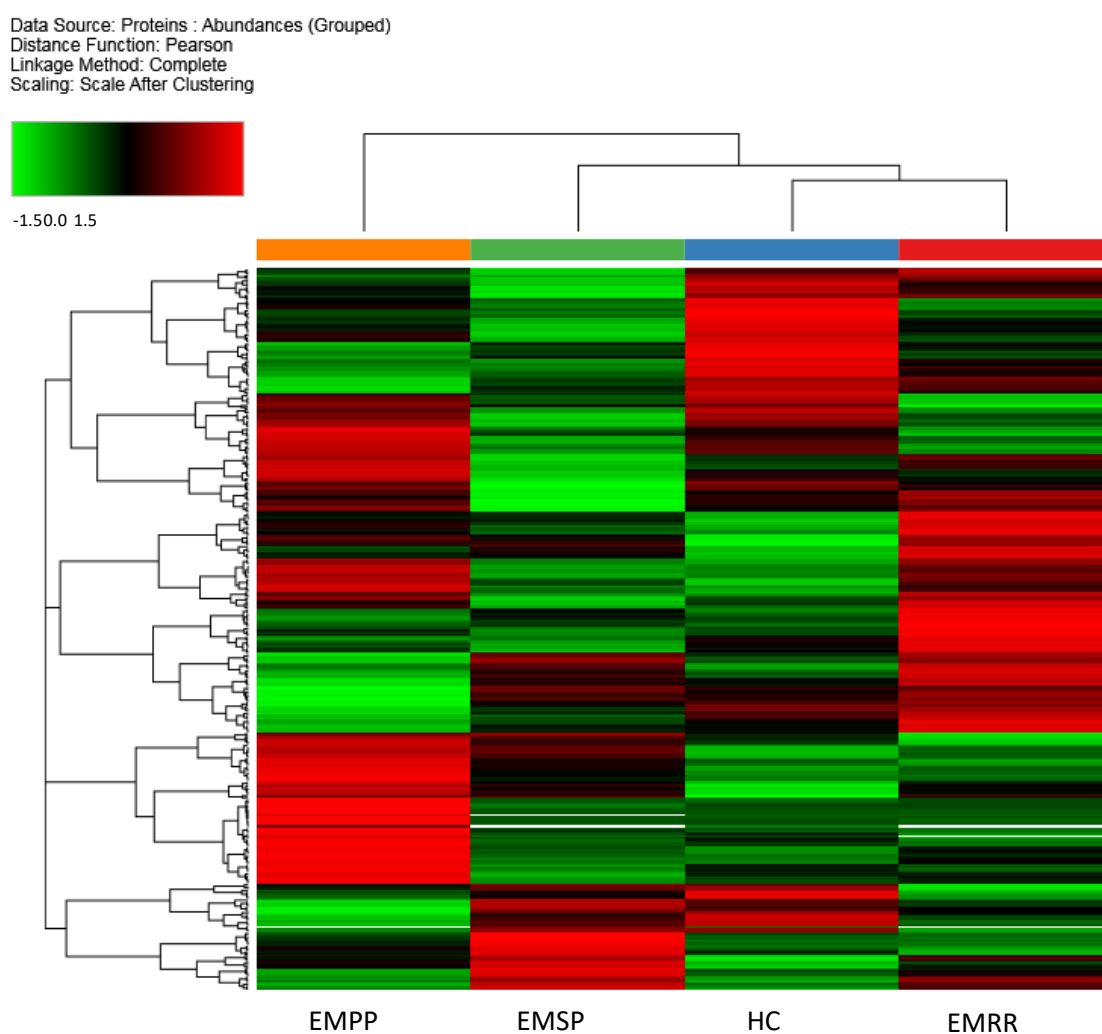


Figura 20. Mapa de calor (Heatmap) del análisis jerárquico de las proteínas agrupadas por homologías. En la comparación se incluyen los perfiles de ratios de abundancia proteica de las distintas formas clínicas de EM y los controles. Los colores verde y rojo representan una menor o mayor abundancia, respectivamente.

El total de proteínas obtenidas en la comparación de las distintas formas clínicas de EM y los sujetos HC se representó en gráficos volcán (*Volcano plot*), que es un diagrama de dispersión. Esta representación nos da información de las proteínas (puntos en el diagrama) cuya abundancia está significativamente elevada o reprimida (Figura 21). Se consideraron proteínas con abundancia diferencial (DAP) aquellas proteínas que mostraron una ratio de abundancia (AR) o *fold change* (FC) <0.5 ó >2 y que resultaron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) entre grupos de formas clínicas y/o de control.

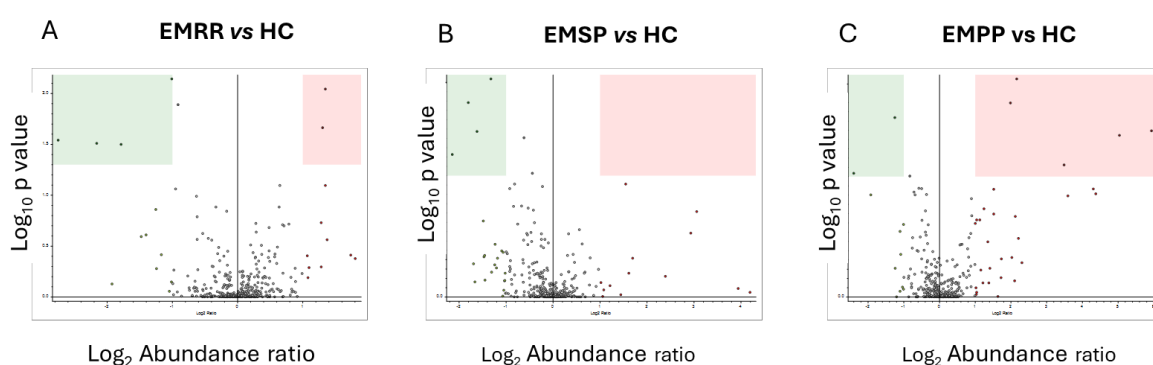


Figura 21. Volcano plots que representan la cuantificación de proteínas mediante análisis HPLC-HRMS mostrando las diferencias en abundancia proteica en la muestra de exploración. (A) pacientes con EMRR vs. HC, (B) pacientes con EMSP vs. HC, (C) pacientes con EMPP vs. HC. El eje “x” representa el log₂ de la razón de abundancia (AR) o fold change (FC) de las proteínas. Los valores > 1 indican proteínas con una AR al menos 2 veces mayor en el primer grupo de la comparación, mientras que los valores < -1 indican proteínas con una AR al menos 2 veces mayor en el segundo grupo. El eje de las “y” muestra el log₁₀ del valor p (t de Student), donde valores más altos indican una mayor significancia estadística. Las proteínas con una AR menor que 0.5 y un valor $p < 0.05$ (disminución de la abundancia) están resaltadas en rectángulos verdes, mientras que aquellas con una AR mayor que 2 y un valor $p < 0.05$ (aumento de la abundancia) se muestran en rectángulos rosados.

4.1.3. OBJETIVO I.a. Selección proteínas candidatas a biomarcadores que discriminen entre pacientes con las diferentes formas clínicas de EM y controles sanos

En la Tabla 7 se presentan las proteínas con abundancia diferencial en pacientes con EMRR en la comparación con HC. La proteína estimuladora de macrófagos (MST1) y la proteína 2 relacionada con el factor H del complemento (CFHR2) mostraron un enriquecimiento superior al doble en pacientes con EMRR respecto a los controles. Por el contrario, la glicoproteína alfa-1B (A1BG), la constante kappa de la inmunoglobulina (IGKC), la cadena ligera de la inmunoglobulina kappa y el receptor III-A de la región Fc

de baja afinidad de la inmunoglobulina gamma (FCGR3A) mostraron una tasa de abundancia más baja en pacientes con EMRR que en los controles.

Tabla 7. Proteínas desreguladas en el grupo de pacientes con EMRR frente a HC en el análisis proteómico

Uniprot	Gen	EMRR vs HC	AR	p-valor
P26927	MST1	Proteína estimuladora de macrófagos	2,55	0,009
P36980-1	CFHR2	Proteína 2 relacionada con el factor H del complemento	2,47	0,021
P04217	A1BG	Glicoproteína alfa-1B	0,5	0,007
P01834	IGKC	Constante kappa de la inmunoglobulina	0,29	0,031
P08637	FCGR3A	Receptor III-A de la región Fc de baja afinidad de la inmunoglobulina gamma	0,22	0,031
P0DOX7	IGK	Cadena ligera de la inmunoglobulina kappa	0,15	0,028

AR: Tasa de abundancia

Por otro lado, los pacientes con EMSP mostraron una AR más baja de las proteínas FCGR3A, cadena ligera de la inmunoglobulina kappa, IGKC y la actinina 1-alfa (ACTN1) que los controles, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Proteínas desreguladas en el grupo de pacientes con EMSP frente a HC en el análisis proteómico.

Uniprot	Gen	EMSP vs HC	AR	p-valor
P08637	FCGR3A	Receptor III-A de la región Fc de baja afinidad de la inmunoglobulina gamma	0,33	0,016
P0DOX7	IGK	Cadena ligera de la inmunoglobulina kappa	0,23	0,029
P01834	IGKC	Constante kappa de la inmunoglobulina	0,29	0,008
P12814-1	ACTN1	Actinina 1-alfa	0,4	0,004

AR: Ratio de abundancia

Entre las proteínas que aumentaron significativamente en pacientes con EMPP en comparación con HC se encuentran: la proteína S100-A6 (S100A6) enriquecida más de 60 veces, la elastasa de neutrófilos (ELANE), la peroxirredoxina-6 (PRDX6), la fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM1) y el Antígeno 1 de células estromales de médula ósea (BST1). En cambio, la proteína 5 relacionada con el factor H del complemento (CFHR5) y FCGR3A fueron significativamente más bajas en pacientes con EMPP en comparación con HC (Tabla 9).

Tabla 9. Proteínas desreguladas en el grupo de pacientes con EMPP frente a HC en el análisis proteómico.

Uniprot	Gen	EMPP vs HC	AR	p-valor
P06703	S100A6	Proteína S100-A6	61,32	0,016
P08246	ELANE	Elastasa de neutrófilos	32,89	0,018
P30041	PRDX6	Peroxirredoxina-6	11,28	0,037
P18669	PGAM1	Fosfoglicerato mutasa 1	4,49	0,004
Q10588	BST1	Antígeno 1 de células estromales de médula ósea	3,97	0,008
Q9BXR6	CFHR5	Proteína 5 relacionada con factor H del complemento	0,42	0,011
P08637	FCGR3A	Receptor III-A de la región Fc de baja afinidad de la inmunoglobulina gamma	0,19	0.046

AR: Ratio de abundancia

4.1.3.a. Análisis de enriquecimiento funcional

El siguiente paso fue analizar las 15 DAP con la herramienta STRING, que permite analizar y visualizar las interacciones funcionales y físicas entre las proteínas. No se encontró entrada en la base de datos STRING para una de las proteínas, la IGKC, por lo que tuvimos que excluirla del análisis. Por otro lado, la cadena ligera de la inmunoglobulina kappa tampoco tenía una entrada específica, sin embargo, la región variable de dicha cadena sí contaba con entrada (IGKV2D-28) por lo tanto, esta región de la proteína sí se incluyó en el análisis. De este modo se obtuvieron las redes de interacciones proteína-proteína, representadas en la Figura 22. Cada nodo representa una proteína y las líneas de unión entre ellas representan una interacción física y/o funcional.

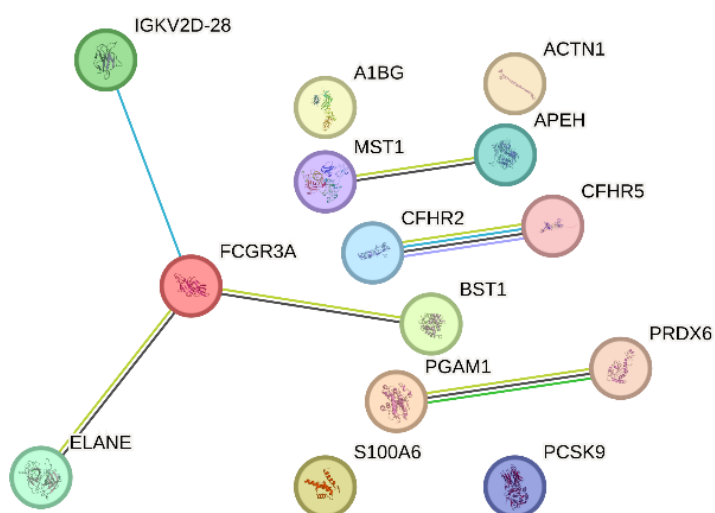


Figura 22. Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING, correspondiente a las proteínas con abundancia diferencial La red está compuesta por 14 nodos y 6 conexiones con un coeficiente de agrupamiento promedio de 0,643, y un enriquecimiento significativo de la interacción proteína-proteína ($p = 0,00078$). Los nodos representan las proteínas y las líneas que unen los nodos representan el tipo de interacción entre las proteínas. Las azules son interacciones con evidencia (procedentes de bases de datos), las verdes representan interacciones predichas (por vecindad génica), las amarillo verdosas por minería de textos, las negras por coexpresión, y las lilas por homología proteica.

En esta red se observan los 14 nodos de proteínas y sus enlaces. En la figura se observan cuatro redes separadas, una que incluye 4 nodos y 3 interacciones, que abarca las proteínas IGKV2D-28, FCGR3A, ELANE y BST1. Y otras 3 redes con 2 proteínas cada una: PGAM1 y PRDX6, CFHR2 y CFHR5, y MST1 y APEH. El resto de las proteínas se representan aisladas.

El coeficiente de agrupamiento mide cuán interconectadas están las proteínas dentro de la red y puede tomar valores entre 0 (proteínas dispersas y sin conexiones entre sí) y 1 (proteínas muy interconectadas, formando grupos bien definidos). En este caso, el coeficiente promedio es de 0,643, lo que indica que, dentro de la red de estas 14 proteínas, hay una tendencia a formar grupos interconectados con una densidad moderada. Además, hay un enriquecimiento estadísticamente significativo de la interacción proteína-proteína ($p = 0,00078$), lo cual indica que la cantidad de conexiones entre las proteínas en la red es significativamente mayor de lo que se esperaría al azar y sugiere que las proteínas están biológicamente conectadas como un grupo funcional.

Dado que la red inicial presentaba interacciones limitadas, utilizamos la opción de STRING para añadir hasta 10 interactores en la capa y subcapa de la red. Esto permitió mejorar la conectividad entre las proteínas de interés, facilitando una interpretación biológica más sólida de las relaciones funcionales entre las proteínas analizadas. El coeficiente de agrupamiento promedio fue de 0,777, con un enriquecimiento de la interacción proteína-proteína ($p < 1,0E^{-16}$). Sin embargo, al analizar en detalle los procesos biológicos en los que podrían estar involucradas estas redes de proteínas, con el software Cytoscape y la aplicación MCODE, se identificaron dos clústeres, uno con 8 nodos y 27 interacciones, y el otro con 5 nodos y 20 interacciones en los que sólo se identifica una de nuestras DAP y en los que los nodos resaltados como más representativos correspondían a proteínas añadidas en la expansión de la red mediante

STRING. Por ello, optamos por analizar directamente las vías asociadas a las 14 DAP en su conjunto mediante la herramienta *Reactome*. Este enfoque nos permite identificar rutas biológicas relevantes para nuestras proteínas de interés sin la influencia de las interacciones añadidas por STRING.

En la Tabla 10 se recogen las vías *Reactome*, ordenadas por su FDR, en las que aparecen involucradas el conjunto de DAP en la comparación entre las formas clínicas de EM y los sujetos control.

Tabla 10. Vías Reactome, ordenadas por valor de FDR, de las proteínas diferencialmente representadas en el análisis proteómico del suero de pacientes con EM, comparado con controles sanos

Vía Reactome	Entidades		p-valor	FDR
	Encontradas	Totales		
<i>Regulación de la cascada del complemento</i>	6	135	1,68E ⁻⁷	1,87E ⁻⁵
<i>Cascada del complemento</i>	6	146	2,65E ⁻⁷	1,87E ⁻⁵
<i>Sistema inmune innato</i>	12	1.187	3,90E ⁻⁷	1,87E ⁻⁵
<i>Detoxificación de especies reactivas de oxígeno</i>	3	39	5,69E ⁻⁵	2,05E ⁻³
<i>Degranulación de neutrófilos</i>	6	478	2,17E ⁻⁴	6,30E ⁻³
<i>Sistema inmune</i>	12	2.220	2,66E ⁻⁴	6,38E ⁻³
<i>Activación de FCGR</i>	3	101	9,15E ⁻⁴	1,83E ⁻²
<i>Papel de los fosfolípidos en la fagocitosis</i>	3	114	1,30E ⁻³	2,33E ⁻²
<i>Síntesis de IL10 mediada por FCGR3A</i>	3	128	1,80E ⁻³	2,88E ⁻²
<i>Fagocitosis mediada por FCGR3A</i>	3	149	2,77E ⁻³	3,10E ⁻²
<i>Infección parasitaria</i>	3	149	2,77E ⁻³	3,10E ⁻²
<i>Fagocitosis de Leishmania</i>	3	149	2,77E ⁻³	3,10E ⁻²
<i>Regulación de la dinámica de actina para la formación de la copa fagocítica</i>	3	150	2,82E ⁻³	3,10E ⁻²
<i>Crecimiento y supervivencia del parásito Leishmania</i>	3	167	3,81E ⁻³	3,43E ⁻²
<i>Respuesta antiinflamatoria que favorece la infección por el parásito Leishmania</i>	3	167	3,81E ⁻³	3,43E ⁻²
<i>Fagocitosis dependiente del receptor Fc gamma (FCGR)</i>	3	175	4,34E ⁻³	3,91E ⁻²

Análisis de sobrerrepresentación: prueba estadística que evalúa si ciertas rutas de Reactome están enriquecidas en los datos enviados. Indica si la lista contiene más proteínas asociadas a una ruta de lo esperado al azar. El valor de p se corrige por tasa de falso descubrimiento (FDR) usando el método de Benjamini-Hochberg.

4.1.3.b. Análisis de enriquecimiento funcional de DAP entre pacientes con EM y HC en función de la ratio de abundancia

Para obtener una comprensión más profunda de las vías biológicas asociadas con las DAP, analizamos las vías Reactome en función de si las proteínas eran más o menos

abundantes en la comparación de pacientes con EM y controles sanos, como se ilustra en la Figura 23. Del total de las siete proteínas con mayor abundancia en pacientes, seis (APEH, BST1, CFHR2, ELANE, PGAM1 y PRDX6) se asociaron significativamente con la vía del *Sistema inmune innato* (FDR = 0,02). Dentro de esta vía también se incluyen las vías de *Degradación de neutrófilos* (FDR = 0,02) y *Regulación de cascada del complemento* (FDR = 0,04). Por otro lado, la proteína MST1, también sobreexpresada, se integra en la vía *Señalización por MST1* (FDR = 0,04) relacionada con el proceso biológico *Traducción de señales*.

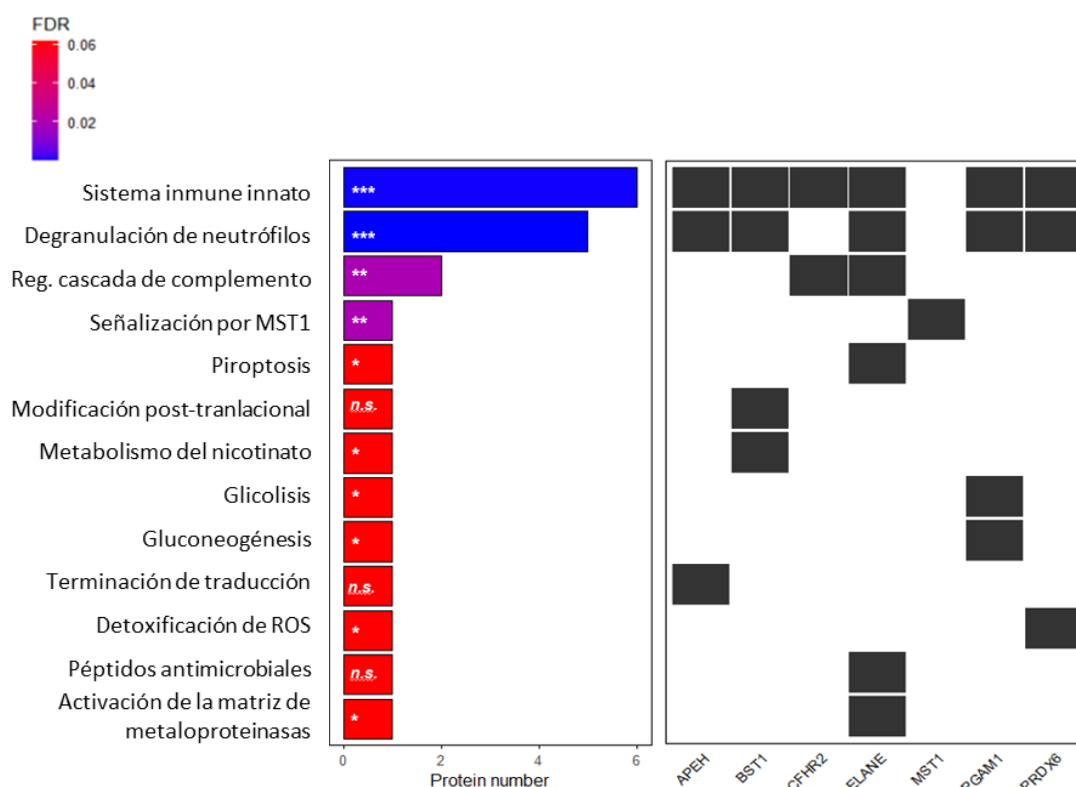


Figura 23. Análisis de enriquecimiento de vías Reactome a partir de DAP séricas con mayor abundancia en pacientes con EM en comparación con controles en la muestra de descubrimiento. El eje X muestra el número de proteínas con abundancia incrementada en la comparación. Los valores de p fueron: * $p \leq 0.03$; ** $p = 0.003$; *** $p = 5.4 \times 10^{-6}$; n.s. = no significativo. Estos valores fueron ajustados por tasa de falsos descubrimientos (FDR) por el método de Benjamini-Hochberg y se indican en una escala de colores a la izquierda.

En cuanto a las seis proteínas con menor abundancia en los pacientes con EM, cuatro (A1BG, CFHR5, FCGR3A e IGKC) estaban asociadas con la vía del *Sistema inmune innato* (FDR = 0,021). Además, tres de estas proteínas (CFHR5, FCGR3A e IGKC) también participaban en dos vías adicionales dentro del *Sistema inmune innato*: *Papel de los fosfolípidos en la fagocitosis* y *Regulación de la cascada del complemento*, ambas con

Resultados

FDR = 0,021. El resto de las vías se recogen en la Figura 24 y se agrupan dentro de las grandes vías Reactome de *Hemostasia*, *Transducción de señal*, *Transporte de pequeñas moléculas* y *Enfermedades Infecciosas*.

Cabe destacar que una de las vías compartidas por las DAP con abundancia incrementada y aquellas con abundancia disminuida es la *Regulación de la cascada del complemento*: FDR = 0,04 para las proteínas con mayor abundancia en pacientes (*CFHR2* y *ELANE*) y FDR = 0,021 para aquellas con menor abundancia (*CFHR5* e *IGKC*).

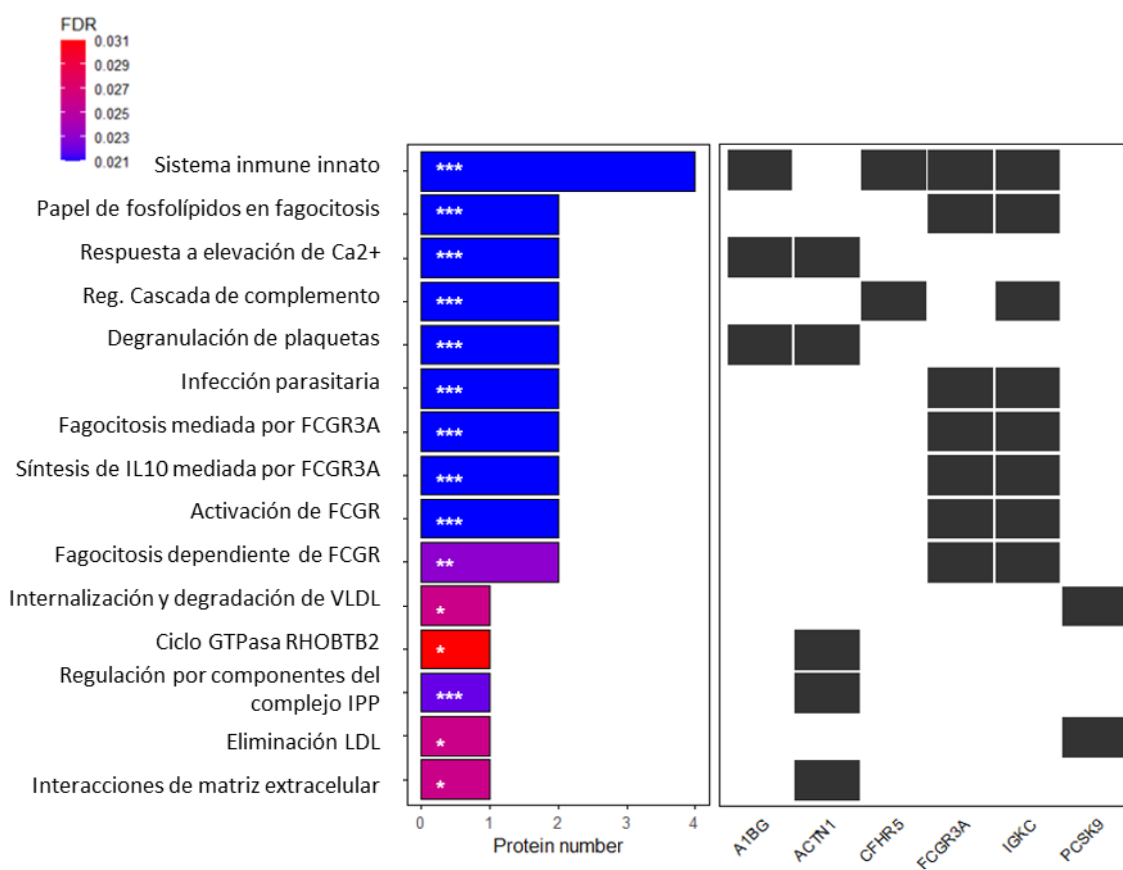


Figura 24. Análisis de enriquecimiento de vías Reactome a partir de DAP séricas con menor abundancia en pacientes con EM en comparación con controles, en la muestra de descubrimiento. El eje X muestra el número de proteínas con abundancia disminuida en la comparación. Los valores de p fueron: * $p \leq 0.015$; ** $p < 0.01$; *** $p \leq 0.005$. Estos valores fueron ajustados por FDR por el método de Benjamini-Hochberg y se indican en una escala de colores a la izquierda.

4.1.3.c. Análisis de enriquecimiento funcional de DAP dentro de las formas clínicas de EM

A continuación, se realizó un análisis exhaustivo de las vías de señalización asociadas a las DAP en cada comparación de grupos, como se detalla en la Tabla 11. La mayoría de

las proteínas alteradas en EMRR o EMSP en comparación con HC se asociaron principalmente con la Activación de FCGR3, incluida en la vía *Fagocitosis dependiente de receptores Fc gamma*, y con la Regulación de la cascada del complemento, ambas dentro de la vía del *Sistema Inmune Innato*. También se observaron asociaciones relevantes con la vía de Señalización por MST1, incluida en la *Señalización por receptores tirosinquinasa*, en la vía principal de *Transducción de señales*.

Por otro lado, entre las proteínas con abundancia diferencial entre EMPP y HC, seis de las siete estaban implicadas en la vía del *Sistema inmune innato*, fundamentalmente en procesos como la *Degrانulación neutrofílica* y la *Cascada del Complemento*. Además, algunas de ellas participaban en la *Detoxificación de especies reactivas de oxígeno*. Cabe destacar que la proteína S100A6, no reconocida por la base de datos Reactome, está implicada en la *regulación de la diferenciación y proliferación celular*, en la *respuesta al estrés oxidativo y mecánico*, así como en la *regulación y síntesis de prostaglandinas*.

Tabla 11. Asignación a vías Reactome de proteínas diferencialmente abundantes en pacientes con diferentes formas clínicas de EM en comparación con controles

	Proteína	Vía Reactome	FDR	p-valor
EMRR vs. HC	FCGR3A, IGKC	<i>Activación de FCGR3</i>	0,012	0,001
		<i>Papel de los fosfolípidos en la fagocitosis</i>	0,012	0,002
		<i>Síntesis de IL10 mediada por FCGR3A</i>	0,012	0,002
	CFHR2, IGKC	<i>Regulación de la cascada del complemento</i>	0,012	0,003
	A1BG, FCGR3A, CFHR2, IGKC	<i>Sistema inmune innato</i>	0,012	0,003
	MST1	<i>Señalización por MST1</i>	0,012	0,003
EMSP vs. HC	FCGR3A, IGKC	<i>Activación de FCGR3</i>	0,006	4,3E ⁻⁴
		<i>Papel de los fosfolípidos en la fagocitosis</i>	0,006	5,5E ⁻⁴
		<i>Síntesis de IL10 mediada por FCGR3A</i>	0,006	6,9E ⁻⁴
		<i>Fagocitosis de Leishmania</i>	0,006	9,3E ⁻⁴
		<i>Fagocitosis dependiente del receptor Fc gamma (FCGR)</i>	0,006	0,001
	ACTN1	<i>Regulación de la remodelación del citoesqueleto y dispersión celular por componentes del complejo PINCH-ILK-Parvin</i>	0,011	0,003
EMPP vs. HC	ELANE, PRDX6, PGAM1, BST1, CFHR5, FCGR3A	<i>Sistema inmune innato</i>	3,06E ⁻⁴	6,9E ⁻⁶
	ELANE, PRDX6, BST1, PGAM1	<i>Degrانulación de neutrófilos</i>	0,002	8,4E ⁻⁵
	ELANE, CFHR5	<i>Regulación de la cascada del complemento</i>	0,025	0,003

4.1.4. OBJETIVO I.b. Identificación proteínas asociadas a la actividad de la enfermedad dentro de las formas clínicas EMRR, EMSP y EMPP

A continuación, se representan los Volcano plots de las proteínas con abundancia diferencial entre las distintas formas clínicas de EM. En la comparación entre pacientes con EMRR y EMPP, se identificaron dos proteínas con menor abundancia en EMRR y una proteína con mayor abundancia (Figura 25A). Por otro lado, en la comparación entre pacientes con EMSP y EMPP, se observó una proteína con una abundancia notablemente mayor en el grupo EMPP (Figura 25B). No se observaron proteínas que presentaran una abundancia diferencial entre las dos formas clínicas de inicio en brotes, EMRR y EMSP.

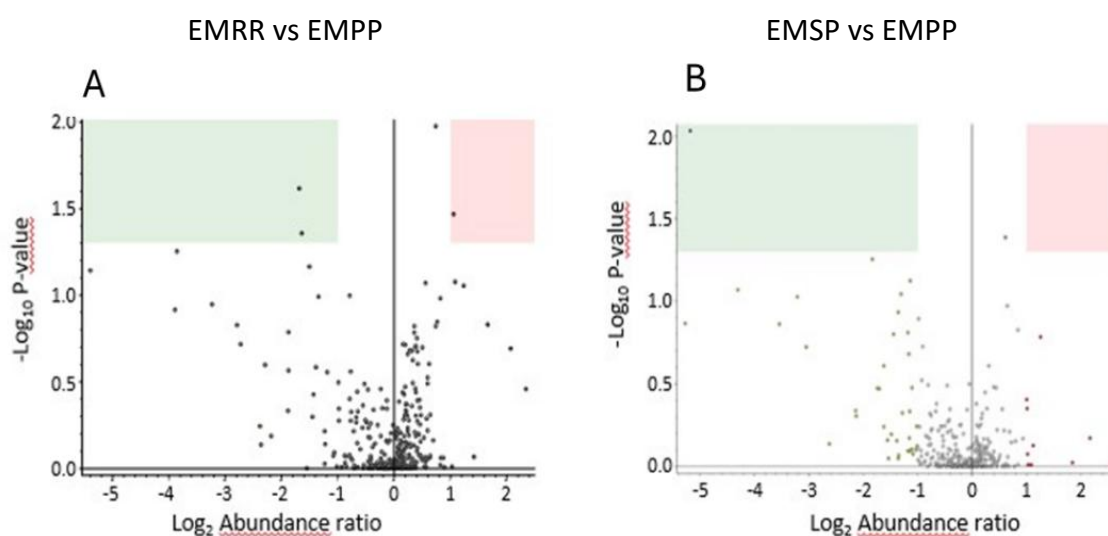


Figura 25. Volcano plots que representan la cuantificación de proteínas mediante análisis HPLC-HRMS mostrando las diferencias en abundancia proteica en la muestra de exploración. (A) pacientes con EMRR vs. EMPP y (B) pacientes con EMSP vs. EMPP. El eje “x” representa el $\log_2$ de la razón de abundancia (AR) o fold change (FC) de las proteínas. Los valores > 1 indican proteínas con una AR al menos 2 veces mayor en el primer grupo de la comparación, mientras que los valores < -1 indican proteínas con una AR al menos 2 veces mayor en el segundo grupo. El eje de las “y” muestra el $\log_{10}$ del valor p (t de Student), donde valores más altos indican una mayor significancia estadística. Las proteínas con una AR menor que 0.5 y un valor p < 0.05 (disminución de la abundancia) están resaltadas en rectángulos verdes, mientras que aquellas con una AR mayor que 2 y un valor p < 0.05 (aumento de la abundancia) se muestran en rectángulos rosados.

Las proteínas con abundancia diferencial entre los pacientes con formas EMRR, EMSP y EMPP, se recogen en las Tablas 12 y 13.

Entre las proteínas con abundancia diferencial en pacientes con EMPP frente a aquellos con EMRR, PGAM1 y la enzima liberadora de ácido acilamino (APEH) mostraron una

mayor AR en el grupo de pacientes con EMPP, mientras que la convertasa 9 de proproteína (PCSK9) mostró una AR más elevada en los pacientes con EMRR (Tabla 12).

Tabla 12. Proteínas con abundancia diferencial en el grupo de pacientes con EMRR frente a EMPP en el análisis proteómico exploratorio

Uniprot	Gen	EMRR vs EMPP	AR	p -valor
P18669	PGAM1	Fosfoglicerato mutasa 1	0,312	0,024
P13798	APEH	Enzima liberadora de ácido acilamino	0,322	0,044
Q8NBP7-1	PCSK9	Convertasa 9 de proproteína	2.077	0.034

AR: Ratio de abundancia

Por otra parte, la elastasa de neutrófilos (ELANE) presentó una abundancia mucho más elevada en los pacientes con EMPP frente a aquellos con EMSP (Tabla 13).

Tabla 13. Proteínas con abundancia diferencial en el grupo de pacientes con EMPP frente a EMSP en el análisis proteómico exploratorio

Uniprot	Gen	EMPP vs EMSP	AR	p-valor
P08246	ELANE	Elastasa de neutrófilos	36,127	0,009

AR: Ratio de abundancia

Enriquecimiento funcional de DAP dentro de la comparación entre las diferentes formas clínicas entre sí

Las DAP que se presentaban una abundancia diferencial entre pacientes con EMPP y EMRR estaban relacionadas con la *Internalización y degradación del receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLR)*, un proceso clave en la regulación del metabolismo lipídico y la homeostasis celular en el SNC. Por otro lado, la DAP sobreabundante en las formas EMPP en comparación con las formas EMSP estaba involucrada en la vía de la *Piroptosis*, un tipo de muerte celular inflamatoria mediada por caspasas, y en la *Activación de metaloproteinasas de matriz*, vías que juegan un papel fundamental en la neuroinflamación y el daño tisular en la EM (Tabla 14).

Tabla 14. Asignación a vías Reactome de proteínas diferencialmente abundantes entre pacientes con diferentes formas clínicas de EM entre sí

	Proteína	Vía Reactome	FDR	p-valor
EMPP vs. EMRR	PCSK9	<i>Internalización y degradación de VLDLR</i>	0,026	0,004
		<i>Eliminación de LDL</i>	0,026	0,005
		<i>Ensamblaje, remodelación y eliminación de lipoproteínas plasmáticas</i>	0,027	0,019
		<i>Fosforilación de proteínas postraduccionales</i>	0,027	0,027
		<i>Regulación del transporte y captación del factor de crecimiento similar a la insulina por IGFBPs</i>	0,031	0,031
	APEH, PGAM1	<i>Degranulación de neutrófilos</i>	0,026	0,005
		<i>Sistema inmune innato</i>	0,029	0,029
	PGAM1	<i>Gluconeogénesis</i>	0,026	0,007
		<i>Glucólisis</i>	0,027	0,020
		<i>Metabolismo de la glucosa</i>	0,027	0,023
	APEH	<i>Terminación de la traducción en eucariotas</i>	0,027	0,027
EMPP vs. EMSP	ELANE	<i>Piroptosis</i>	0,012	0,002
		<i>Activación de metaloproteinasas de matriz</i>	0,012	0,003
		<i>Regulación de la cascada del complemento</i>	0,012	0,011

4.2. OBJETIVO II. Validación por enzimoimmunoensayo de las proteínas con mayor poder discriminativo en el análisis proteómico

4.2.1. Características demográficas y clínicas de los sujetos seleccionados

A partir de los registros médicos se obtuvieron los datos demográficos y clínicos, que se recogen en la Tabla 15. La existencia de enfermedad activa se determinó por la presencia de nuevos síntomas o la exacerbación de los existentes y/o por la presencia de nuevas lesiones o lesiones con realce de gadolinio en la RMN.

La escala de gravedad de la EM (del inglés *Multiple Sclerosis Severity Score*, MSSS) es una herramienta utilizada para evaluar la gravedad de la enfermedad, es decir, lo rápido que evoluciona la discapacidad en un paciente determinado. Se basa en la puntuación obtenida en la escala EDSS estandarizada según la duración de la enfermedad y su valor se obtiene de unas tablas estandarizadas. Nos indica la gravedad de la enfermedad en un paciente concreto al compararlo con pacientes con una duración de la enfermedad similar.

Tabla 15. Características demográficas y clínicas de los pacientes con Esclerosis Múltiple (EM) y sujetos control (HC) incluidos en la fase de validación del estudio proteómico

HC n=21		EM n=80		p-valor	
Edad (años)	44,0 (35,5-52,0)	43,50 (37,0-50,75)		n.s.	
Mujeres, n (%)	15 (71,4%)	59 (73,8%)		n.s.	
		EMRR n=38	EMSP n = 21	EMPP n = 21	p-valor
Edad (años)		39,5 (31,0-44,5)	45,0 (42,0-51,0)	50,0 (40,5-55,5)	< 0,001
Mujeres, n (%)		30 (78,9%)	16 (76,2%)	13 (61,9%)	n.s.
Tiempo de evolución		2,0 (0,87-13,5)	16 (10-21)	4,0 (2-9,5)	<0,001
EDSS		1,0 (1,0-1,5)	6,0 (4,0-6,0)	3,5 (2,75-6,0)	< 0,001
MSSS		1,77 (0,67-2,65)	5,61 (4,55-6,57)	7,2 7 (6,25-8,44)	<0,0001
Tasa anualizada de brotes		1,0 (1,0-1,0)	0,0 (0-1,5)	-	<0,001
Pacientes con actividad por RMN		9/38	1/21	5/21	

Los datos cuantitativos se presentan como medianas con rangos intercuartílicos. p-valor: Se refiere a los valores de p obtenidos de las comparaciones entre los controles sanos y los pacientes con EM mediante la prueba de Mann-Whitney (edad) y la prueba de chi-cuadrado (género). Los p-valores para las comparaciones entre las tres formas clínicas de la EM se calcularon utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de pruebas de comparación por pares (edad, duración de la enfermedad y EDSS). EMRR: EM Remitente Recurrente, EMSP: EM Secundaria Progresiva, EMPP: EM Primaria Progresiva. Tiempo de evolución: nº de años desde el inicio de la enfermedad hasta el momento de recolección de la muestra; EDSS: Escala Expandida del Estado de Discapacidad; MSSS: Puntuación en la escala de severidad de la EM; Recaídas: nº de recaídas en el año anterior. Pacientes con actividad por RMN: nº de pacientes con lesiones nuevas o aumentadas en secuencias T2 o lesiones captantes de gadolinio en T1; n.s., no significativo.

Las características demográficas de la muestra de validación en el momento de la toma de muestras no mostraron diferencias significativas entre los pacientes con EM y los controles, en términos de sexo y edad (Tabla 15). Los pacientes con EMRR fueron, en promedio, más jóvenes que los pacientes con EMSP ($p_{\text{adj}} = 0,002$) y EMPP ($p_{\text{adj}} < 0,001$), sin mostrar diferencias estadísticas entre las dos formas progresivas. La relación hombre/mujer no presentó diferencias significativas entre los pacientes con EM en las

tres formas clínicas. El tiempo de evolución de la enfermedad fue mayor en el grupo de EMSP en comparación con los pacientes con EMRR y EMPP ($p_{\text{adj}} < 0,001$ en ambas comparaciones). La puntuación en la escala EDSS, como era de esperar, fue significativamente más baja en EMRR que en ambas formas progresivas ($p_{\text{adj}} < 0,001$ en ambos casos). La puntuación en la escala MSSS también fue significativamente menor en EMRR en comparación con las formas progresivas ($p_{\text{adj}} < 0,0001$ al compararlo con pacientes con EMSP y $p_{\text{adj}} < 1 \times 10^{-7}$ al compararlo con pacientes con EMPP). Este valor también fue significativamente más bajo en pacientes con EMSP en comparación con aquellos con EMPP ($p_{\text{adj}} = 0,002$). Se detectó actividad radiológica de la enfermedad en 9 pacientes del grupo de EMRR, en 1 del EMSP y en 5 del EMPP.

4.2.2. Fase de validación del estudio proteómico. Enzimoinmunoanálisis

En la fase de descubrimiento de nuestro estudio, identificamos 13 proteínas diferencialmente abundantes en pacientes con EM en comparación con HC, con siete proteínas mostrando una mayor AR y seis presentando AR más bajas en los pacientes con EM. Es relevante destacar que dos de estas proteínas (ELANE y PGAM1), junto con otras dos adicionales (APEH y PCSK9), mostraron abundancia diferencial también entre los pacientes con EMPP y aquellos con EM de inicio en brotes (ROMS, *del inglés relapsing-onset MS*).

La validación se realizó mediante ELISA en una muestra independiente de pacientes. Para ello, se seleccionaron 12 de las 15 proteínas con abundancia diferencial en la fase exploratoria, debido a la disponibilidad limitada de suero y a restricciones técnicas que impidieron la detección fiable de algunas proteínas. En esta fase de validación, un análisis de potencia *post-hoc* confirmó que se contó con suficiente potencia estadística (0,86 con un valor $\alpha = 0,05$) para detectar tamaños de efecto grandes.

En la fase de validación, seis proteínas mostraron expresión diferencial al analizar globalmente a los pacientes con todas las formas clínicas de EM en comparación con HC. Concretamente, BST1, PRDX6 y APEH resultaron significativamente elevadas en los pacientes con EM tal y como se muestra en la figura 26.

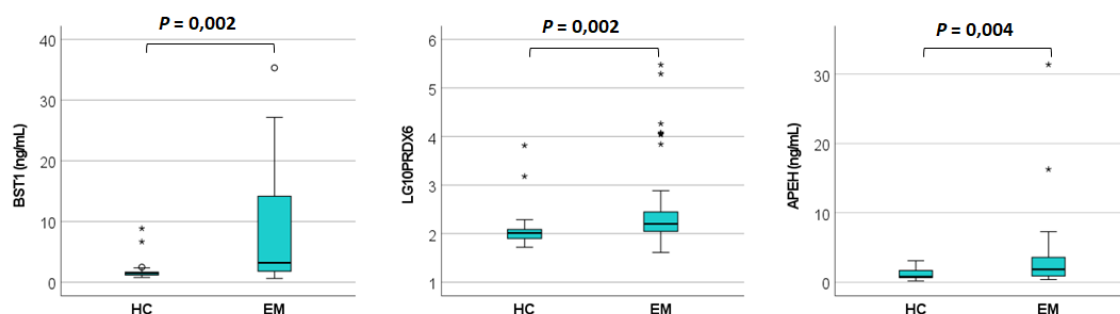


Figura 26. Distribución de los niveles de BST1, PRDX6 y APEH detectados por ELISA en el suero de pacientes con EM y sujetos control (HC). La comparación inicial se realizó con la prueba de Mann-Whitney. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25 y 75. Los bigotes se extienden hasta los percentiles 10 y 90. Los análisis estadísticos se realizaron en datos sin transformar, sólo se aplicó la transformación logarítmica a PRDX6 para la representación gráfica, a fin de mejorar la visualización del enriquecimiento de esta proteína entre grupos.

Las curvas ROC para estas proteínas en la clasificación de EM y HC mostraron las siguientes áreas bajo la curva (AUC) e intervalos de confianza (IC), donde el estado predictivo fue EM: [BST1 (AUC = 0,733, IC = 0,625-0,840; $p = 0.002$); PRDX6 (AUC = 0,720, IC = 0,599-0,841; $p = 0.002$)] y APEH (AUC = 0,712, IC = 0,599-0,826; $p = 0.004$), lo que indica un poder predictivo aceptable (Figura 27).

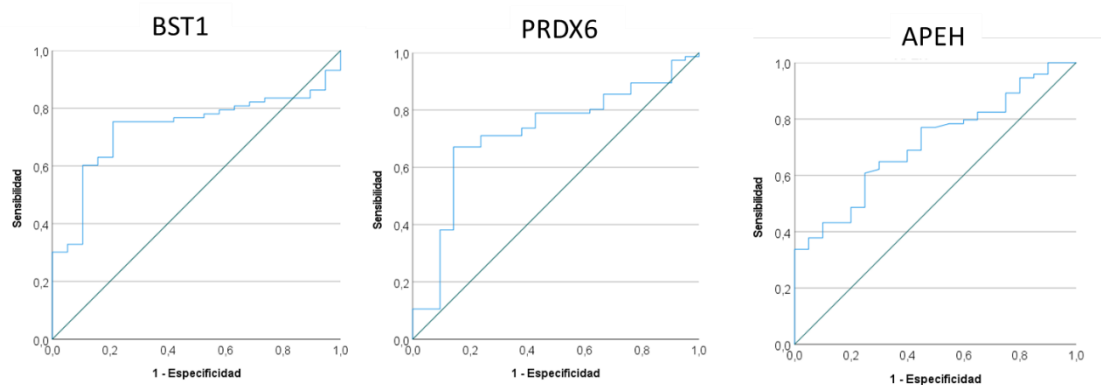


Figura 27. Representación de las curvas ROC de las proteínas BST1, PRDX6 y APEH, donde el estado predictivo era el de padecer EM. Las áreas bajo la curva fueron de 0,733, 0,720 y 0,712, respectivamente.

En cambio, los niveles de CFHR5, MST1 y CFHR2 resultaron significativamente más bajos en las personas con EM en la comparación con HC. El AUC para estas proteínas, donde el estado predictivo fue no padecer EM, fue [CFHR5 (AUC = 0,792, IC = 0,655-0,929, $p =$

0,001); MST1 (AUC = 0,700, IC = 0,552-0,848, $p = 0,006$); y CFHR2 (AUC = 0,650, IC = 0,528-0,772, $p = 0,04$).

Continuando el análisis, al estratificar a los pacientes con EM según su forma clínica, seis proteínas mostraron expresión diferencial en comparación con los controles, con ligeras variaciones respecto a los resultados observados al analizar a los pacientes globalmente (se perdió la significación estadística con CFHR2 y se ganó con FCGR3A para las formas EMPP). Los valores de la mediana y del rango intercuartílico de estas proteínas se detallan en la Tabla 16.

Dado que algunas muestras presentaban concentraciones por encima del límite superior de detección del kit, fue necesario diluirlas y reanalizarlas para obtener valores cuantificables dentro del rango dinámico del ELISA. De esta forma, los niveles de las distintas proteínas se mantuvieron dentro de los límites de detección, excepto en el caso de CFHR5, donde las concentraciones en los controles se situaron dentro de rango, pero la mayoría de los pacientes mostraron concentraciones por debajo del umbral de detección.

Tabla 16. Niveles de suero de las 6 proteínas desreguladas en la muestra de validación al estratificar a los pacientes según su forma clínica

		HC	EMRR	EMSP	EMPP
PRDX6	Mediana	103,07	158,75	141,84	177,64
	(pg/ml) RIQ	74,78 - 123,95	93,07 - 253,18	110,87 - 220,77	137,84 - 8960,0
FCGR3A	Mediana	2951,5	3078,6	3934,1	4576,4
	(pg/ml) RIQ	2017,4 - 3814,7	2375,3 - 4158,5	3319,0 - 5026,9	2961,3 - 4822,6
APEH	Mediana	0,79	1,46	2,02	2,4
	(ng/ml) RIQ	0,65 - 1,80	0,79 - 3,17	1,52 - 3,80	0,92 - 4,86
BST1	Mediana	1,50	5,89	2,53	2,27
	(ng/ml) RIQ	1,18 - 1,68	2,30 - 20,28	1,07 - 5,27	1,26 - 5,32
CFHR5	Mediana	53,86	0	0	10,28
	(pg/ml) RIQ	10,17 - 157,73	0,0 - 27,42	0,0 - 4,15	0,0 - 42,95
MST1	Mediana	20,81	2,45	16,14	18,50
	(ng/ml) RIQ	8,08 - 22,78	0,64 - 5,20	2,09 - 22,78	6,88 - 20,13

HC: control sano; EMRR: EM Remitente recurrente; EMSP: EM Secundaria progresiva; EMPP: EM Primaria progresiva; RIQ: rango intercuartílico

Como los niveles de la mayoría de las proteínas (excepto BST1 y MST1) fueron similares entre las dos formas clínicas de inicio en brotes (EMRR y EMSP), optamos por agruparlas bajo la categoría ROMS para la comparación de la distribución de los niveles de proteínas entre pacientes con EMPP, ROMS y controles sanos (HC), como se muestra en la Figura 28. Cuando alguna de las proteínas mostraba medianas significativamente diferentes entre las dos formas clínicas de inicio en brotes, como en el caso de BST1 y MST1, se muestran también los valores en los cuatro grupos (HC, EMRR, EMSP y EMPP).

Resultados

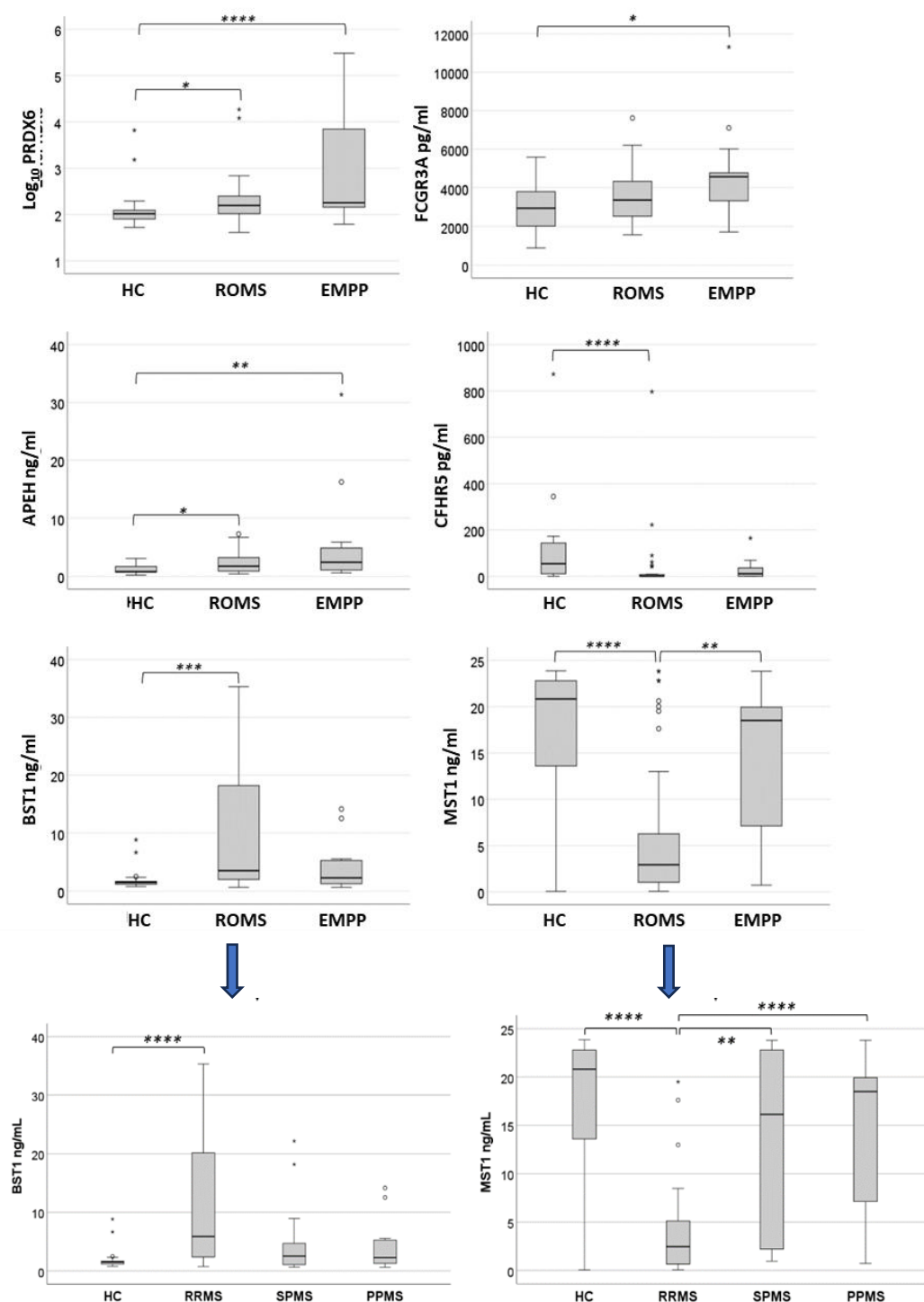


Figura 28. Distribución de los niveles de proteínas detectados por ELISA en el suero de pacientes con EM y sujetos control (HC). La comparación inicial se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis, y cuando las diferencias resultaron significativas se aplicó la corrección de Bonferroni. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25 y 75. Los bigotes se extienden hasta los percentiles 10 y 90. Los análisis estadísticos se realizaron en datos sin transformar, sólo se aplicó la transformación logarítmica a PRDX6 para mejorar la visualización del enriquecimiento de esta proteína entre grupos. Además, se realizó un análisis más detallado de los niveles de BST1 y MST1 entre las tres formas clínicas de EM y los HC. ROMS: pacientes con EM de inicio en brotes; EMRR: pacientes con EM remitente-recurrente; EMSP: pacientes con EM secundaria progresiva; EMPP: pacientes con EM primaria progresiva. * $p_{adj} < 0,05$; ** $p_{adj} < 0,01$; *** $p_{adj} < 0,005$; **** $p_{adj} \leq 0,001$

La prueba de Kruskal-Wallis mostró un enriquecimiento diferencial de PRDX6 ($p = 0,002$), FCGR3A ($p = 0,039$), APEH ($p = 0,009$), CFHR5 ($p = 0,002$), BST1 ($p = 0,002$) y MST1 ($p = 0,0002$), entre los grupos. Además, CFHR2 mostró una tendencia hacia una menor expresión en los pacientes, especialmente en aquellos con la forma EMPP, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística ($p = 0,066$).

- Las comparaciones por pares indicaron un enriquecimiento de PRDX6 en pacientes con EMPP y ROMS en comparación con los controles, lo cual se confirmó posteriormente tras la corrección de Bonferroni ($p_{\text{adj}} = 0,001$ y $p_{\text{adj}} = 0,044$, respectivamente), lo que concuerda con los resultados obtenidos en la fase de descubrimiento.
- A diferencia de lo observado en la muestra de descubrimiento, la validación mediante ELISA detectó un enriquecimiento de FCGR3A en pacientes con EMPP en comparación con los controles ($p_{\text{adj}} = 0,034$).
- Mientras que en la fase de descubrimiento los niveles de APEH se encontraban elevados únicamente en la comparación entre EMPP y EMRR, en la fase de validación, realizada sobre una muestra más amplia, esta proteína mostró niveles elevados tanto en ROMS ($p_{\text{adj}} = 0,038$) como en EMPP ($p_{\text{adj}} = 0,009$) en comparación con los HC.
- Por otro lado, CFHR5 fue menos abundante en ROMS frente a HC durante la validación ($p_{\text{adj}} = 0,001$), pero no alcanzó significancia en EMPP, como se había observado en la fase de descubrimiento.
- La abundancia de BST1 fue significativamente mayor en los pacientes con EMPP que en los controles en la fase exploratoria; sin embargo, la validación mediante ELISA mostró niveles de BST1 significativamente elevados en ROMS ($p_{\text{adj}} = 0,0017$). Al analizar los niveles de esta proteína en los pacientes con ROMS desdoblado en las dos formas clínicas, pudimos comprobar que la significación era causada por un aumento de los niveles en los pacientes con EMRR ($p_{\text{adj}} < 0,0003$).
- El análisis proteómico identificó un enriquecimiento de MST1 en EMRR frente a los controles, pero la validación mediante ELISA mostró resultados discordantes, con MST1 significativamente reducido en ROMS en comparación con HC ($p_{\text{adj}} =$

0,001) y con EMPP ($p_{\text{adj}} = 0,007$). Curiosamente, un análisis adicional mostró que esta reducción estaba principalmente causada por niveles notablemente bajos de MST1 en pacientes con EMRR, que incluso mostraban diferencias estadísticamente significativas con los pacientes con formas EMSP ($p_{\text{adj}} = 0,006$). Las otras proteínas desreguladas en pacientes con EMPP en el análisis proteómico (S100A6, ELANE, PGAM1), en EMRR (PGAM1 y PCSK9) o en EMSP (ELANE) no mostraron enriquecimiento diferencial en suero mediante el análisis por ELISA.

Otro punto a considerar es que varios pares de proteínas mostraron correlaciones bajas en sus niveles de expresión, aunque estadísticamente significativas, entre ellos FCGR3A y CFHR2 (ρ de Spearman = -0,369, $p = 0,001$), BST1 y MST1 ($\rho = -0,417$, $p < 0,0008$), BST1 y PRDX6 ($\rho = 0,384$, $p < 0,0002$), y APEH y PRDX6 ($\rho = 0,555$, $p = 1 \times 10^{-8}$).

4.2.3. Mapeo de proteínas diferencialmente abundantes a vías de Reactome

En la muestra de validación, el análisis de redes utilizando Reactome indicó que las proteínas con abundancia elevada en pacientes con EM muestran un enriquecimiento en vías relacionadas con la Respuesta celular al estrés (como son la *Respuesta celular al estrés químico* y *Desintoxicación de ROS*), el Sistema inmune (como son la *Respuesta inmune innata*, *Desgranulación de neutrófilos* y *Regulación de la cascada del complemento*) y el Metabolismo de proteínas (como la *Síntesis de proteínas ancladas a GPI*). Por otro lado, las proteínas con abundancia disminuida en las muestras de EM están enriquecidas en Vías de transducción de señales (como la *Señalización por MST1* y *Señalización por Hipo*) (Figura 29).

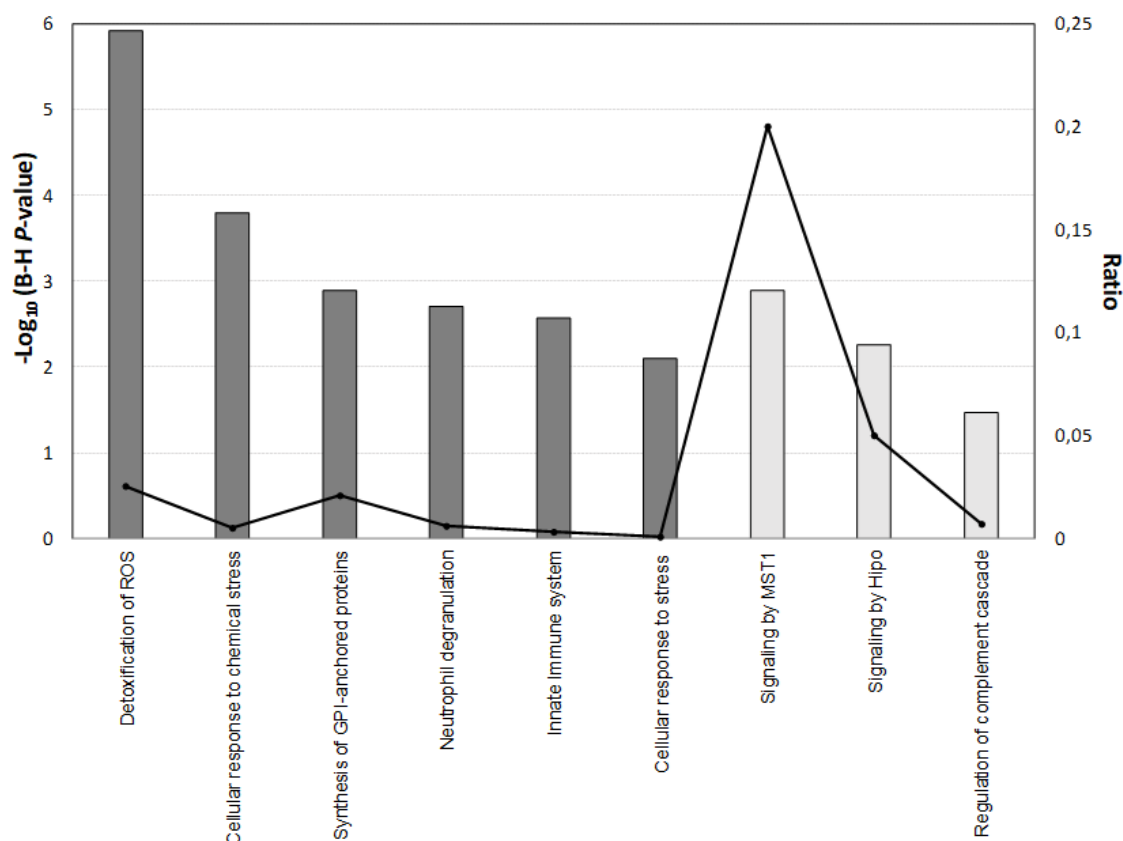


Figura 29. Enriquecimiento de vías de Reactome de proteínas séricas diferencialmente expresadas en pacientes con EM en comparación con los controles, en la muestra de validación. Las barras muestran las vías celulares significativamente enriquecidas en las proteínas sobreexpresadas (gris oscuro) e infraexpresadas (gris claro) en el suero de pacientes con EM frente a controles sanos, tras la corrección por pruebas múltiples mediante el método de Benjamini-Hochberg (eje izquierdo). La línea negra representa la proporción de proteínas diferencialmente expresadas en nuestra muestra de validación en cada vía con respecto al número total de proteínas anotadas en dicha vía según Reactome (eje derecho).

4.2.4. Análisis de proteínas diferencialmente abundantes con otras variables clínicas

Entre las personas con EM, el nivel de discapacidad medido como la puntuación en la escala EDSS en el momento de la toma de la muestra, mostró correlaciones leves pero significativas con FCGR3A (p de Spearman = 0,303, $p = 0,013$), BST1 ($p = -0,325$, $p = 0,005$), PRDX6 ($p = 0,246$, $p = 0,034$) y MST1 ($p = 0,522$, $p = 0,000005$). Por otro lado, la gravedad de la enfermedad, evaluada mediante la escala MSSS, se correlacionó con los niveles de MST1 ($p = 0,396$, $p = 0,00084$) y APEH ($p = 0,230$, $p = 0,05$).

En un paso posterior, el análisis de regresión lineal entre los niveles de proteínas en suero y las medidas de discapacidad/gravedad de la enfermedad en los casos de EM,

ajustado por sexo y edad, reveló asociaciones positivas significativas finalmente entre APEH, MST1 y PRDX6 con las puntuaciones de EDSS, mientras que BST1 mostró una asociación negativa. Tras la corrección por comparaciones múltiples, sólo **MST1 y PRDX6** mantuvieron su significación estadística. Al mismo tiempo, **MST1 y APEH** se mostraron significativamente asociadas con las puntuaciones en la escala MSSS (Tabla 17).

Tabla 17. Resumen de los análisis de regresión lineal que evalúan la asociación entre los niveles de proteínas séricas y las medidas de discapacidad/gravedad de la enfermedad en los pacientes con EM de la muestra de validación.

	Proteína	B	ES	p*	p _{FDR}
EDSS	APEH	0,599	0,263	0,026	0,052
	MST1	2,273	0,494	2,1E ⁻⁵	2,5E⁻⁴
	PRDX6	6554,42	2465,37	0,010	0,030
	BST1	-1,235	0,534	0,024	0,057
MSSS	APEH	0,509	0,181	0,006	0,024
	MST1	1,124	0,356	0,002	0,012

B: Coeficiente de regresión; ES: Error estándar; EDSS: Escala expandida de discapacidad; MSSS: escala de gravedad de la EM. p*= valor de p ajustado por sexo y edad; p_{FDR}: valor de p ajustada por FDR

Con el objetivo de evaluar las posibles implicaciones pronósticas de los niveles desregulados de proteínas en la EM, se analizó la puntuación en la escala MSSS en el momento de la toma de muestras, estratificando a los pacientes según niveles altos o bajos de expresión proteica, definidos a partir del valor de la mediana. Las puntuaciones de MSSS fueron significativamente más altas en los pacientes con niveles elevados de MST1 y APEH, en comparación con aquellos que presentaban niveles más bajos (Figura 30).

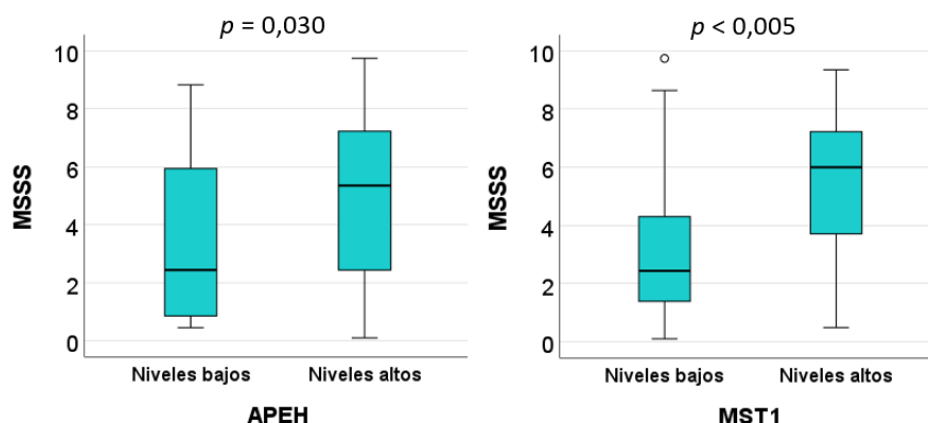


Figura 30. Los niveles elevados de APEH y MST1 en suero se asocian con una mayor gravedad de la enfermedad en pacientes con EM. Las puntuaciones en la escala de gravedad de la EM (MSSS) en el momento de la toma de muestras fueron analizadas en pacientes estratificados en grupos de alta y baja expresión de APEH y MST1, utilizando como valores de corte las medianas de estas proteínas.

No se encontraron otras correlaciones de los niveles de proteínas con ninguna otra variable clínica como tiempo de evolución, tasa anualizada de brotes o número de pacientes con actividad por RMN.

4.3. OBJETIVO III. Análisis transcriptómico mediante RNA-seq en células mononucleares de sangre periférica. Fase exploratoria

4.3.1. Características demográficas y clínicas de los sujetos seleccionados

Las características demográficas de la muestra exploratoria en el momento de la extracción no mostraron diferencias significativas entre los pacientes con EM, OIND y los HC, en términos de sexo y edad (Tabla 18). Los pacientes con EMRR fueron, en promedio, más jóvenes que los pacientes con formas progresivas, pero sin mostrar diferencias estadísticas al hacer la comparación por pares. La relación hombre/mujer no presentó diferencias significativas entre los pacientes con EM en las tres formas clínicas. El tiempo de evolución de la enfermedad fue mayor en el grupo de EMSP en comparación con los pacientes con EMPP ($p_{\text{adj}} < 0,04$). La puntuación en la escala EDSS, como era de esperar, fue significativamente más baja en EMRR que en ambas formas progresivas, siendo estadísticamente significativa entre las formas EMRR y EMSP ($p_{\text{adj}} = 0,001$).

Tabla 18. Características demográficas y clínicas de la población de estudio en el análisis transcriptómico

	HC n=7	EM n=19	OIND n=2	p valor
Edad (años)	35,0 (29,0-55,0)	52,0 (44,0-56,0)	38,5 (22-*)	n.s.
Mujeres, n (%)	5 (71,42%)	12 (63,16%)	2 (100%)	n.s.
	EMRR n=7	EMSP n=7	EMPP n=5	p valor
Edad (años)	45,2 (33,0-51,0)	56,1 (51,4-58,2)	53,3 (45,0-56,5)	0,043
Mujeres, n (%)	4 (57,1%)	4 (57,1%)	4 (80%)	n.s.
Tempo de evolución (años)	2 (1,0-17,0)	14,0 (8,0-20,0)	2,0 (1,0-5,0)	0,028
EDSS	2,0 (1,0-2,5)	5,5 (4,5-6,5)	3,5 (2,75-5,5)	0,002

Todas las variables salvo el número de mujeres vienen definidas por mediana (rango intercuartílico). p-valor: Se refiere a los valores de p obtenidos de las comparaciones entre los diferentes grupos utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de pruebas de comparación por pares (edad, duración de la enfermedad y EDSS). EMRR: EM Remitente Recurrente, EMSP: EM Secundaria Progresiva, EMPP: EM Primaria Progresiva. HC: control sano; OIND: pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias. Tiempo de evolución: nº de años desde el inicio de la enfermedad hasta el momento de recolección de la muestra; EDSS: Escala Expandida del Estado de Discapacidad. n.s., no significativo. * al ser sólo dos pacientes, no puede calcular el percentil 75

4.3.2. Diseño del estudio

En la fase exploratoria se realizó un análisis de expresión de las isoformas generadas por procesamiento alternativo de ARNm de citoquinas y sus receptores, quimiocinas y proteínas involucradas en vías de señalización intracelular, mediante RNA-seq. 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 antecedentes personales o familiares de patología neurológica o autoinmune conocidos, y en 2 individuos con OIND, tal y como se describe en material y métodos. En el momento de la extracción de la muestra, todos los pacientes con EM estaban sin tratamiento modificador de la enfermedad y se hallaban en fase de remisión.

Dado que el procesamiento alternativo del ARN puede generar múltiples variantes transcripcionales a partir de un mismo gen, algunas de estas isoformas conservan la

capacidad de codificar proteínas funcionales, mientras que otras no, desempeñando funciones reguladoras o siendo blanco de mecanismos de degradación.

Dada la complejidad del análisis de los datos transcriptómicos, y para una mejor comprensión, se ha seguido un esquema uniforme en la presentación de los resultados para todas las comparaciones. En cada caso, se incluyen los siguientes elementos:

- Un mapa de calor (heatmap) con las 50 isoformas de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial.
- Una tabla resumen con los valores del Log2 Fold Change ajustado (Shrunken Log₂FC), la significación estadística y el biotipo de cada isoforma.
- Un análisis de interacción proteína-proteína entre los genes correspondientes.
- Un análisis de enriquecimiento funcional de rutas Reactome, basado en las isoformas diferencialmente expresadas entre los grupos comparados.

Todo ello se muestra de forma integrada en la Figura 31:

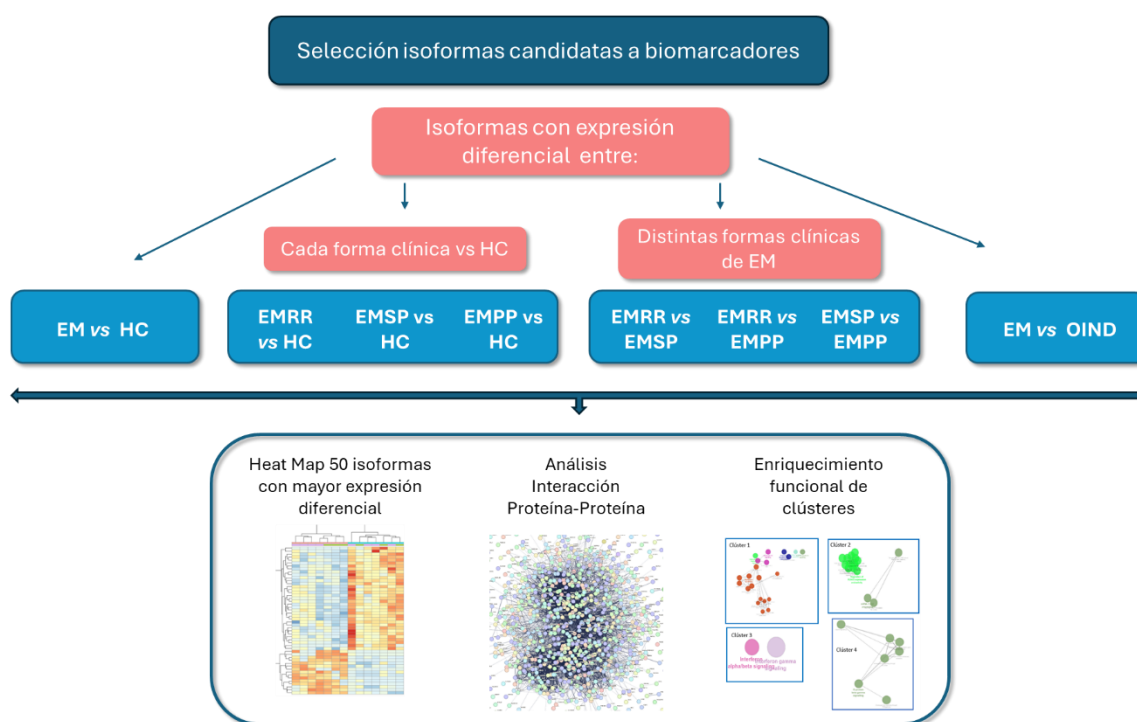


Figura 31. Diagrama de flujo en la redacción de resultados de cada comparación realizada

4.3.3. OBJETIVO III.a. Selección de isoformas transcriptómicas candidatas a biomarcadores diagnósticos

4.3.3.a. Diferencias de expresión génica de las isoformas de procesamiento alternativo entre la totalidad de los pacientes con EM y controles sanos

En el análisis transcriptómico mediante RNA-seq de las PBMC de pacientes con EM y controles sanos, se identificaron 59.128 isoformas generadas por procesamiento o splicing alternativo del ARN. En particular, al comparar globalmente la expresión génica de todos los pacientes con EM (incluyendo las tres formas clínicas) con la de los controles sanos, se identificaron 1.344 isoformas diferencialmente expresadas (395 infraexpresadas y 949 sobreexpresadas), correspondientes a 993 genes distintos.

En el siguiente mapa de calor mostramos las 50 isoformas de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial (Figura 32). En él se puede observar una marcada heterogeneidad en los patrones de expresión de las isoformas entre los pacientes con EM, lo que permite identificar tres posibles subgrupos transcriptómicos: un grupo de 9 pacientes (❶) con una expresión radicalmente opuesta a la de los controles, otro grupo de 8 pacientes (❷) en los que la expresión de algunas isoformas de procesamiento alternativo es similar al primer grupo de pacientes, pero la expresión de otras es muy similar a la de los controles y, por último, un tercer grupo de 2 pacientes (❸) con una expresión similar a la de los controles.

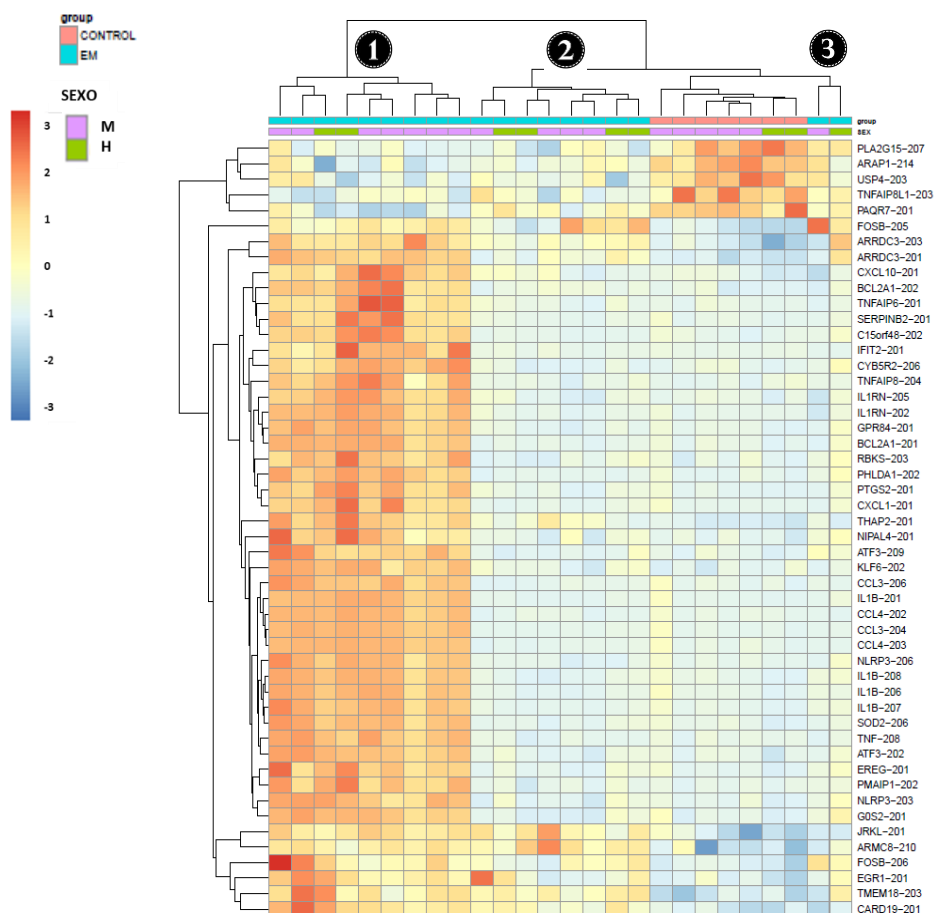


Figura 32. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre todos los pacientes con EM y controles sanos. ①, ② y ③ representan los subgrupos de pacientes EM con diferencias en el patrón de expresión de las isoformas mostradas. EM: Esclerosis múltiple, M: mujer, H: hombre

En la Tabla 19 se detallan las 50 isoformas mostradas en el mapa de calor con mayor expresión diferencial entre pacientes con EM y controles, así como los valores del Shrunken Log₂FC.

Se consideraron como diferencialmente expresados aquellos transcritos de las isoformas de procesamiento alternativo que presentaron un Shrunken Log₂FC $\geq |0,585|$, lo que equivale a un cambio de al menos 1,5 veces en la expresión entre grupos, y una $p_{adj} < 0,05$.

Tabla 19. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EM (agrupando todas las formas clínicas) y controles sanos.

Resultados

Transcrito	Isoformas de procesamiento alternativo	Log ₂ FC	Shrunken Log ₂ FC	p _{adj}	Biotipo
ENST00000586113.1	FOSB-205	3,95	2,096	7,11E ⁻⁰⁸	NP (RI)
ENST00000405941.3	TMEM18-203	4,12	1,965	2,12E ⁻⁰⁶	CP (143 aa)
ENST00000367468.10	PTGS2-201	6,88	0,865	2,62E ⁻⁰⁶	CP (604 aa)
ENST00000244869.3	EREG-201	6,48	0,924	4,98E ⁻⁰⁶	CP (169 aa)
ENST00000299502.9	SERPINB2-201	7,46	0,695	5,89E ⁻⁰⁶	CP (415 aa)
ENST00000586615.5	FOSB-206	3,70	1,830	7,87E ⁻⁰⁶	CP (289 aa)
ENST00000263341.7	IL1B-201	7,87	0,597	9,01E ⁻⁰⁶	CP (269 aa)
ENST00000491056.5	IL1B-207	7,35	0,686	9,01E ⁻⁰⁶	CDS ND
ENST00000613922.2	CCL3-204	7,71	0,593	1,68E ⁻⁰⁵	CP (92 aa)
ENST00000613922.2	CCL3-204	7,71	0,590	1,68E ⁻⁰⁵	CP (92 aa)
ENST00000452684.2	SOD2-206	5,42	1,107	2,19E ⁻⁰⁵	CP (140 aa)
ENST00000371826.4	IFIT2-201	5,91	0,940	2,61E ⁻⁰⁵	CP (472 aa)
ENST00000505631.1	ARRDC3-203	1,89	1,532	2,61E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000265138.4	ARRDC3-201	1,96	1,576	2,91E ⁻⁰⁵	CP (414 aa)
ENST00000496280.5	IL1B-208	6,36	0,805	3,40E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000335661.6	BCL2A1-202	4,23	1,508	3,78E ⁻⁰⁵	CP (163 aa)
ENST00000366496.7	NLRP3-203	5,82	0,918	4,10E ⁻⁰⁵	CP (977 aa)
ENST00000396650.7	C15orf48-202	6,42	0,787	4,10E ⁻⁰⁵	CP (83 aa)
ENST00000615863.2	CCL4-202	5,97	0,882	4,10E ⁻⁰⁵	CP (92 aa)
ENST00000602540.5	PHLDA1-202	5,11	1,135	4,43E ⁻⁰⁵	CP (260 aa)
ENST00000541623.5	ARAP1-214	-1,08	-1,008	5,82E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000267015.4	GPR84-201	4,98	1,150	6,34E ⁻⁰⁵	CP (396 aa)
ENST00000243347.5	TNFAIP6-201	5,88	0,900	6,56E ⁻⁰⁵	CP (277 aa)
ENST00000621626.1	CCL4-203	6,33	0,760	6,56E ⁻⁰⁵	CP (52 aa)
ENST00000395761.4	CXCL1-201	7,04	0,610	8,57E ⁻⁰⁵	CP (107 aa)
ENST00000487639.1	IL1B-206	6,19	0,780	8,57E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000492118.2	ATF3-209	3,83	1,560	9,33E ⁻⁰⁵	CDS ND
ENST00000367029.5	GOS2-201	5,59	0,910	9,84E ⁻⁰⁵	CP (103 aa)
ENST00000503646.1	TNFAIP8-204	5,83	0,850	1,00E ⁻⁰⁴	CP (198 aa)
ENST00000375464.7	CARD19-201	2,42	1,670	1,20E ⁻⁰⁴	CP (183 aa)
ENST00000449264.3	TNF-208	4,45	1,290	1,20E ⁻⁰⁴	CP (233 aa)
ENST00000354115.6	IL1RN-202	4,23	1,340	1,30E ⁻⁰⁴	CP (159 aa)
ENST00000380946.3	KLF6-202	4,33	1,340	1,30E ⁻⁰⁴	CDS ND
ENST00000308086.3	THAP2-201	2,42	1,660	1,40E ⁻⁰⁴	CP (228 aa)
ENST00000332349.5	JRKL-201	1,26	1,130	1,40E ⁻⁰⁴	CP (524 aa)
ENST00000613922.2	CCL3-204	5,65	0,860	1,50E ⁻⁰⁴	CP (92 aa)
ENST00000415188.1	USP4-203	-1,00	-0,940	1,60E ⁻⁰⁴	CP (363 aa)
ENST00000565460.1	PLA2G15-207	-1,44	-1,260	1,90E ⁻⁰⁴	NP (RI)
ENST00000469044.6	ARMC8-210	1,04	0,960	2,00E ⁻⁰⁴	CP (673 aa)
ENST00000267953.4	BCL2A1-201	3,94	1,390	2,10E ⁻⁰⁴	CP (175 aa)
ENST00000316660.7	PMAIP1-202	3,89	1,410	2,30E ⁻⁰⁴	CP (54 aa)
ENST00000239938.5	EGR1-201	2,84	1,610	2,40E ⁻⁰⁴	CP (543 aa)
ENST00000311946.8	NIPAL4-201	3,86	1,420	2,40E ⁻⁰⁴	CP (404 aa)

ENST00000391828.8	NLRP3-206	4,76	1,080	2,40E ⁻⁰⁴	CP (1034 aa)
ENST00000453412.1	RBKS-203	4,24	1,280	2,40E ⁻⁰⁴	NP (NMD)
ENST00000598107.1	TNFAIP8L1-203	-1,43	-1,250	2,40E ⁻⁰⁴	CDS ND
ENST00000341491.9	ATF3-202	3,52	1,510	2,50E ⁻⁰⁴	CP (181 aa)
ENST00000526084.1	CYB5R2-206	4,34	1,280	2,70E ⁻⁰⁴	NP (RI)
ENST00000374296.4	PAQR7-201	-1,13	-1,030	2,80E ⁻⁰⁴	CP (346 aa)
ENST00000409930.4	IL1RN-205	4,56	1,130	2,80E ⁻⁰⁴	CP (177 aa)

Biotipos: CP: codifica proteína; NP: no codifica proteína; CDS ND: CDS no definido; RI: retención de intrón; NMD: degradación del ARNm mediada por codones STOP. Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos de la proteína para la que codifica.

Dentro de estas 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial, la mayoría se encontraban sobreexpresadas en los pacientes con EM con respecto a los controles. Los genes de estas isoformas pertenecían a las vías de:

- *señalización de citoquinas (CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL10, IL1 β , IL1RN, PTGS2, TNF- α , EGR1, SOD2, SERPINB2 e IFIT2)*
- *reclutamiento celular (respuesta inflamatoria) (NLRP3 e IL1 β)*
- *activación de NOXA y translocación a las mitocondrias (PMAIP1)*
- *transcripción estimulada por factor de crecimiento nervioso NGF (EGR1 y FOSB)*
- *inflammasoma NLRP3 (NLRP3)*
- *regulación de genes dependientes de MITF-M implicados en apoptosis (BCL2A1)*

Sin embargo, se encontraron 5 isoformas infraexpresadas en los pacientes en comparación con los controles pertenecientes a genes involucrados en:

- *la vía del metabolismo fosfolipídico (la fosfolipasa lisosomal [PLA2G15] y la proteína 1 similar a la proteína 8 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa [TNFAIP8L1]),*
- *señalización por tirosina-quinasas no receptoras (ARAP1),*
- *señalización proapoptótica inducida por el receptor 1 del TNF- α (USP4).*

El gen de la isoforma 201 del receptor de la progesterona (PAQR7-201) no pudo asociarse a ninguna vía Reactome.

Enriquecimiento de rutas de la expresión diferencial entre la totalidad de los pacientes con EM y HC

Se lanzaron los 955 genes correspondientes a las 1299 isoformas con expresión diferencial a la plataforma STRING y se obtuvo una red con 7619 interacciones proteína-proteína y un coeficiente promedio de clustering de 0,385, lo que muestra una red con

módulos o grupos bastante marcados, y un valor de enriquecimiento proteína-proteína $p < 1,0E^{-16}$ (Figura 33).

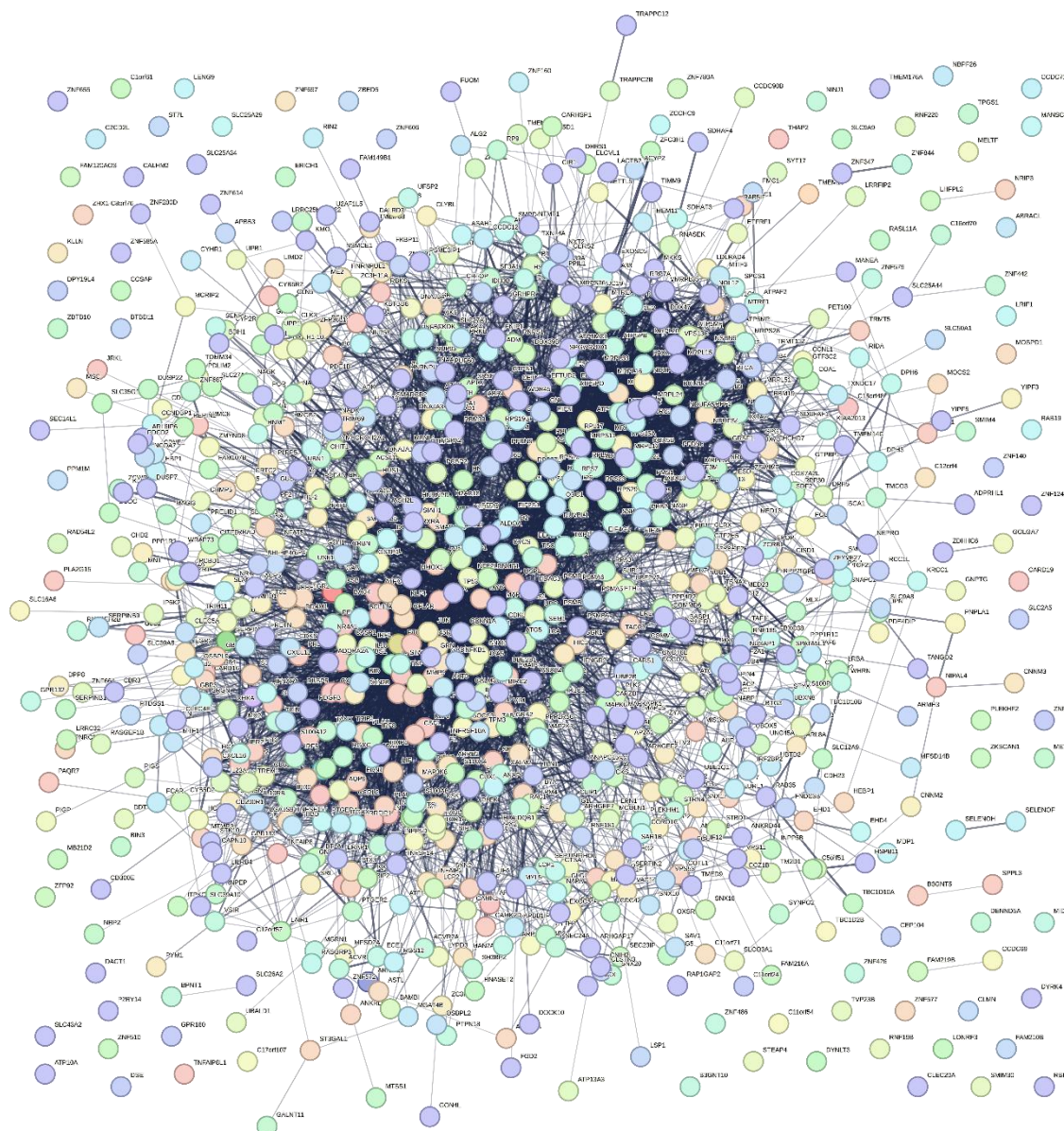
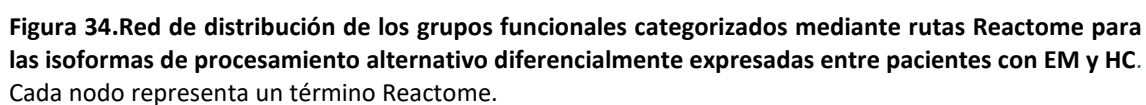


Figura 33.Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING, correspondiente a las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con EM y HC

Las proteínas correspondientes a las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas se introdujeron en Cytoscape y se analizaron mediante



Clúster 1: 50 nodos, 715 interacciones y score = 29,18. Rutas: *Traducción e Iniciación a la traducción mitocondrial.*

Clúster 2: 55 nodos, 528 interacciones y score = 19,56. Rutas: *Necrosis regulada*, *Inflamasoma NLRP3* y *Señalización por interleucinas*

Clúster 3: 51 nodos, 177 interacciones y score = 7,08. Rutas: *Fosforilación del APC/C y Transporte electrónico respiratorio*

Clúster 4: 7 nodos, 21 interacciones y score = 7,00. Rutas: *Inicio de la transcripción por ARN polimerasa II*

Clúster 5: 29 nodos, 89 interacciones y score = 6,35. Rutas: *Empalme de mRNA* y *Señalización del TCR*

Clúster 6: 17 nodos, 37 interacciones y score = 4,62. Rutas: *Transporte de mRNAs maduros derivados de transcritos sin intrones* y *Las RMT metilan argininas de histonas*

4.3.3.b. Diferencias de expresión génica de las isoformas de procesamiento alternativo entre las diferentes formas clínicas de EM y los controles sanos.

Cuando se analizó la expresión génica de las isoformas de procesamiento alternativo en función de cada forma clínica comparada con los controles sanos, los pacientes con EMRR mostraron 1182 variantes expresadas diferencialmente (VED) con respecto a los controles, los pacientes con EMSP mostraron 7776 y los pacientes con EMPP mostraron 48. Estas VED en comparación con los controles se distribuyeron como se muestra en la Figura 35.

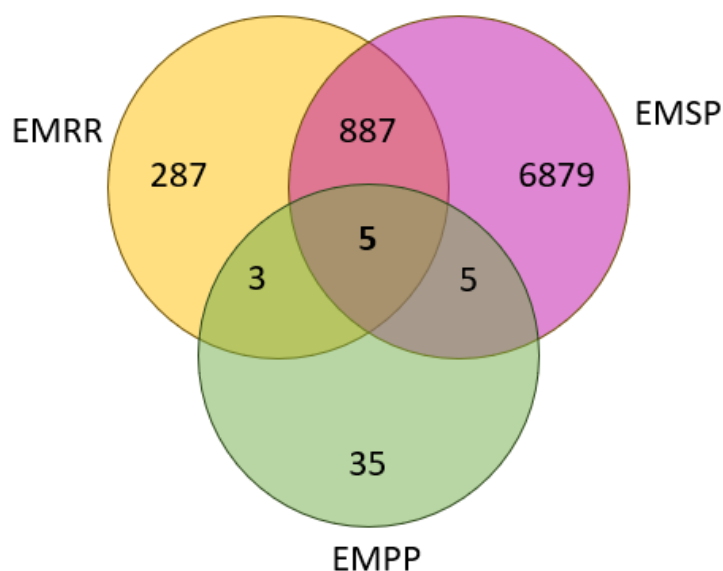


Figura 35. Diagrama de Venn de las variantes de procesamiento alternativo expresadas diferencialmente en las diferentes formas clínicas de EM con respecto a los controles. Se tomaron como resultados significativos aquellos que presentaban una $p_{adj} < 0,05$ y un cambio en la expresión del Shrunken $\text{Log}_2\text{FC} \geq |0,585|$.

Como se puede observar en la Figura 34, sólo 5 isoformas de procesamiento alternativo se encontraron diferencialmente expresadas en todas las formas clínicas de EM en comparación con los controles (CETN3-201, CISD1-201, ELAC1-201, FOSB-205 y JRKL-201).

Pacientes con EMPP:

Se identificaron 48 isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas frente a los controles, distribuidas de la siguiente manera:

- 35 exclusivas de la forma EMPP
- 3 compartidas con la forma EMRR
- 5 compartidas con la forma EMSP
- 5 comunes a las tres formas clínicas de EM

Pacientes con EMRR:

Se detectaron 1182 VED respecto a los controles:

- 287 exclusivas de EMRR
- 887 compartidas con EMSP
- 3 compartidas con EMPP
- 5 comunes a las tres formas clínicas de EM

Pacientes con EMSP:

Se identificaron 7776 VED en comparación con los controles:

- 6879 exclusivas de EMSP
- 887 compartidas con EMRR
- 5 compartidas con EMPP
- 5 comunes a las tres formas clínicas de EM

4.3.3.b.I. Diferencias de expresión génica de las isoformas de procesamiento alternativo entre pacientes con EMRR y controles sanos

De las 1182 VED, 385 estaban infraexpresadas y 797 sobreexpresadas en los pacientes con EMRR frente a los controles sanos.

En el siguiente mapa de calor se muestran las 50 isoformas de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en pacientes con EMRR al compararlos con controles (Figura 36).

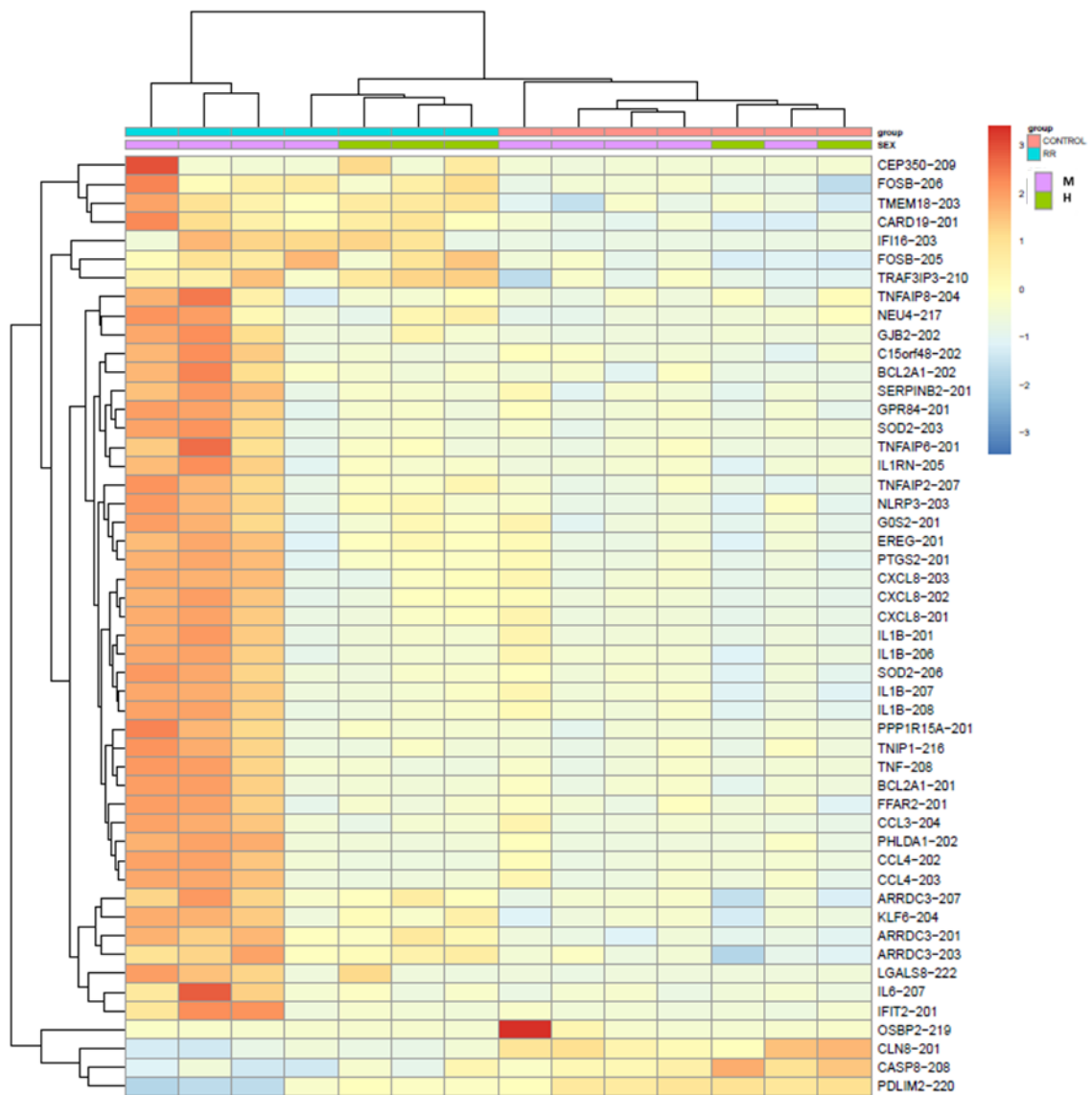


Figura 36. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMRR y controles sanos. EMRR: Esclerosis múltiple remitente recurrente, M: mujer, H: hombre

En la Tabla 20 se pueden observar las diferencias de expresión de los 50 transcritos más significativos entre el grupo EMRR y el grupo control.

Tabla 20. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMRR y controles sanos

Transcrito	Isoforma de procesamiento alternativo	Log ₂ FC	Shrunken Log ₂ FC	p _{adj}	Biotipo
ENST00000527974.5	LGALS8-222	22,68	0,854	1,63E ⁻²¹	CP (359 aa)
ENST00000490141.5	CEP350-209	21,22	0,872	7,13E ⁻²⁰	CDS ND
ENST00000713559.1	OSBP2-219	-22,56	-0,680	1,16E ⁻¹⁹	CP (541 aa)
ENST00000265138.4	ARRDC3-201	1,90	1,825	1,77E ⁻¹⁰	CP (414 aa)
ENST00000401931.2	CXCL8-202	7,74	2,691	4,82E ⁻⁰⁷	CP (95 aa)
ENST00000426291.5	IL6-207	9,60	2,110	6,77E ⁻⁰⁷	CP (152 aa)
ENST00000263341.7	IL1B-201	7,16	2,710	1,35E ⁻⁰⁶	CP (269 aa)
ENST00000491056.5	IL1B-207	6,43	3,079	1,43E ⁻⁰⁶	CDS ND
ENST00000452684.2	SOD2-206	4,70	3,385	2,45E ⁻⁰⁶	CP (140 aa)
ENST00000618597.1	NEU4-217	6,81	3,038	2,84E ⁻⁰⁶	NP (RI)
ENST00000613922.2	CCL3-204	7,07	2,628	2,94E ⁻⁰⁶	CP (92 aa)
ENST00000244869.3	EREG-201	4,86	3,201	3,27E ⁻⁰⁶	CP (169 aa)
ENST00000367468.10	PTGS2-201	5,70	3,072	3,45E ⁻⁰⁶	CP (604 aa)
ENST00000586113.1	FOSB-205	4,22	2,924	3,73E ⁻⁰⁶	NP (RI)
ENST00000405941.3	TMEM18-203	4,45	3,094	4,26E ⁻⁰⁶	CP (143 aa)
ENST00000299502.9	SERPINB2-201	6,47	2,777	4,28E ⁻⁰⁶	CP (415 aa)
ENST00000267015.4	GPR84-201	4,58	3,313	7,20E ⁻⁰⁶	CP (396 aa)
ENST00000367029.5	GOS2-201	5,18	3,296	9,55E ⁻⁰⁶	CP (103 aa)
ENST00000505631.1	ARRDC3-203	1,99	1,819	1,17E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000396650.7	C15orf48-202	6,01	3,040	1,39E ⁻⁰⁵	CP (83 aa)
ENST00000474496.5	TRAF3IP3-210	1,83	1,706	1,46E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000615863.2	CCL4-202	5,34	3,117	2,04E ⁻⁰⁵	CP (533 aa)
ENST00000621626.1	CCL4-203	5,64	3,080	2,04E ⁻⁰⁵	CP (52 aa)
ENST00000307407.8	CXCL8-201	7,69	1,800	3,20E ⁻⁰⁵	CP (99 aa)
ENST00000496280.5	IL1B-208	5,46	3,030	4,30E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000449264.3	TNF-208	4,14	3,224	4,30E ⁻⁰⁵	CP (233 aa)
ENST00000243347.5	TNFAIP6-201	5,52	3,072	4,90E ⁻⁰⁵	CP (277 aa)
ENST00000602540.5	PHLDA1-202	4,14	3,039	5,15E ⁻⁰⁵	CP (260 aa)
ENST00000514284.5	ARRDC3-207	1,90	1,745	5,34E ⁻⁰⁵	CDS ND
ENST00000366496.7	NLRP3-203	5,16	3,001	5,50E ⁻⁰⁵	CP (977 aa)
ENST00000522926.1	TNIP1-216	4,75	3,185	7,09E ⁻⁰⁵	CDS ND
ENST00000483500.1	CXCL8-203	6,16	2,509	7,38E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000246549.2	FFAR2-201	4,16	3,081	7,41E ⁻⁰⁵	CP (330 aa)
ENST00000382848.5	GJB2-202	10,07	0,970	8,55E ⁻⁰⁵	CP (226 aa)
ENST00000429881.2	CASP8-208	-1,62	-1,515	8,61E ⁻⁰⁵	CP (183 aa)
ENST00000335661.6	BCL2A1-202	3,85	2,912	8,67E ⁻⁰⁵	CP (163 aa)
ENST00000371826.4	IFIT2-201	4,89	2,943	8,73E ⁻⁰⁵	CP (472 aa)
ENST00000622226.1	PDLIM2-220	-1,29	-1,229	9,07E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000367055.8	SOD2-203	3,90	2,943	9,07E ⁻⁰⁵	CP (222 aa)
ENST00000375464.7	CARD19-201	2,66	2,258	1,33E ⁻⁰⁴	CP (183 aa)
ENST00000586615.5	FOSB-206	3,45	2,559	1,44E ⁻⁰⁴	CP (289 aa)
ENST00000331222.6	CLN8-201	-0,82	-0,807	1,61E ⁻⁰⁴	CP (286 aa)
ENST00000487639.1	IL1B-206	5,21	2,930	1,61E ⁻⁰⁴	NP (RI)
ENST00000409930.4	IL1RN-205	4,09	2,950	1,61E ⁻⁰⁴	CP (177 aa)
ENST00000200453.6	PPP1R15A-201	3,25	2,692	1,61E ⁻⁰⁴	CP (674 aa)
ENST00000503646.1	TNFAIP8-204	5,29	2,727	1,61E ⁻⁰⁴	CP (198 aa)
ENST00000267953.4	BCL2A1-201	3,39	2,729	1,72E ⁻⁰⁴	CP (175 aa)
ENST00000469435.1	KLF6-204	1,83	1,689	1,72E ⁻⁰⁴	CP (281 aa)
ENST00000368131.8	IFI16-203	7,16	1,977	1,87E ⁻⁰⁴	CP (729 aa)

Resultados

ENST00000560562.5	TNFAIP2-207	3,62	2,836	1,91E ⁻⁰⁴	CP (97 aa)

Biotipos: CP: codifica proteína; NP: no codifica proteína; CDS ND: CDS no definido; RI: retención de intrón.
Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos de la proteína para la que codifica.

Dentro de estas 50 isoformas de procesamiento alternativo con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMRR y controles sanos, la mayoría se encontraban sobreexpresadas en los pacientes. Sin embargo, hubo 4 isoformas infraexpresadas en estos pacientes respecto a los controles: la isoforma 219 codificante de la proteína 2 de unión a oxiesteros (OSBP2-219), la isoforma 208 codificante de la caspasa 8 (CASP8-208), la isoforma 220 con retención de intrón de la proteína 2 con dominios PDZ y LIM (PDLIM2-220) y la isoforma 201 codificante de la proteína transmembrana CLN8 del retículo endoplasmático y del compartimento intermedio RE-Golgi (CLN8-201).

Enriquecimiento de rutas de la expresión diferencial entre los grupos EMRR y HC

Se lanzaron los 880 genes de las 1182 isoformas con expresión diferencial a la plataforma STRING y se obtuvo una red con 8258 interacciones proteína-proteína y un coeficiente promedio de clustering de 0,425, lo que muestra una red con módulos o grupos bastante marcados, y un valor de enriquecimiento proteína-proteína $p < 1,0E^{-16}$ (Figura 37).

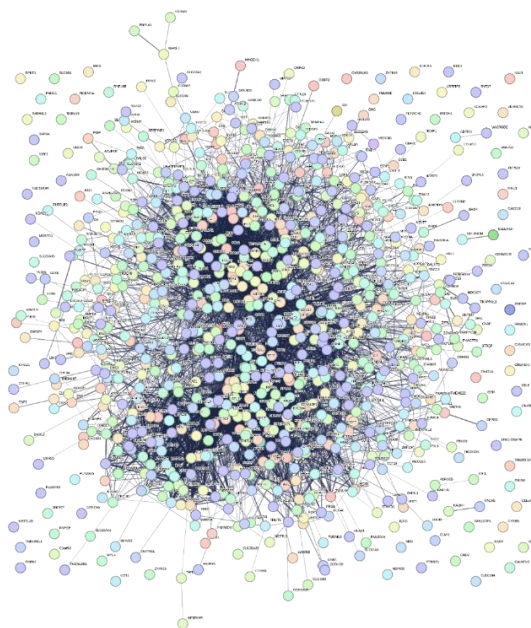


Figura 37. Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING, correspondiente a las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con EMRR y HC



A continuación, utilizando la aplicación ClueGO, se analizaron las rutas *Reactome* diferencialmente enriquecidas ($p_{adj} \leq 0,01$) en cada clúster, que se recogen en las Tablas suplementarias 8 a la 13 (Anexo II) siendo algunas de las rutas:

Clúster 1: 55 nodos, 1336 interacciones y score = 49,48. Rutas: *Metabolismo de aminoácidos y proteínas, Metabolismo de ARN, Autofagia, Respuesta celular a estímulos, Desarrollo del Sistema Nervioso.*

Clúster 2: 45 nodos, 420 interacciones y score = 19,09. Rutas: *Señalización en el sistema inmune por Interleucinas IL1, IL4, IL13, IL6, IL10 e IL20, Muerte celular programada por Piroptosis, Activación de NFkB en células B.*

Clúster 3: 54 nodos, 278 interacciones y score = 10,49. Rutas: *Ciclo celular, Respuesta celular a estrés, Replicación de ADN, Sistema inmune adaptativo, Señalización en el sistema inmune por Interferón e IL1, Metabolismo de proteínas, Muerte celular programada por apoptosis.*

Clúster 4: 17 nodos, 77 interacciones y score = 9,62. Rutas: *Metabolismo del ARN: Procesamiento de Pre-ARNm con intrones, Splicing de ARNm y formación del complejo espliceosomal.*

Clúster 5: 9 nodos, 25 interacciones y score = 6,25. Rutas: *Señalización del sistema inmune por interferón.*

Clúster 6: 18 nodos, 40 interacciones y score = 4,71. Rutas: *Respuesta celular al estrés, Organización de cromatina, Regulación de transcripción por pequeños ARN, Señalización del sistema inmune por interferón, Transporte mediado por vesículas.*

4.3.3.b.II. Diferencias de expresión génica de las isoformas de procesamiento alternativo entre pacientes con EMSP y HC

En la comparación con los controles, los pacientes con EMSP mostraron 7776 VED (3153 infraexpresadas y 4623 sobreexpresadas).

El siguiente mapa de calor (Figura 39) muestra la existencia de perfiles diferenciales de expresión génica entre pacientes con EMSP y controles sanos. Se observó un grupo claramente definido de genes, mayoritariamente relacionados con procesos inflamatorios e inmunitarios (como *CXCL8*, *IL1B*, o *PTGS2*), que presentan una sobreexpresión significativa en los pacientes EMSP en comparación con los controles, mientras que otro como *PDLIM2*, relacionados con la adhesión y migración celular, estaba significativamente infraexpresado.

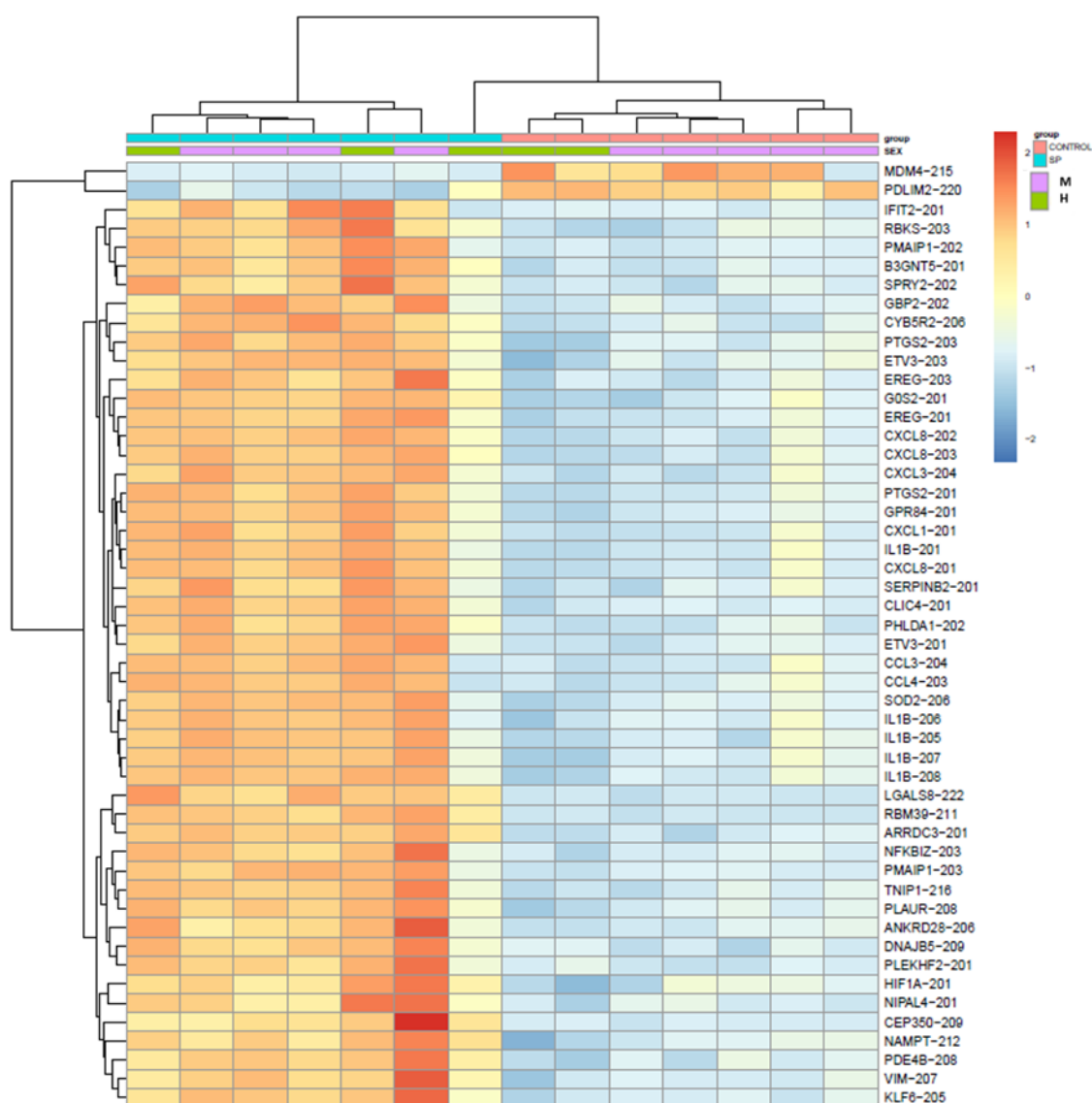


Figura 39. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMSP y controles sanos. EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva, M: mujer, H: hombre.

La Tabla 21 muestra las 50 isoformas con mayor expresión diferencial entre los pacientes con EMSP y los controles, ordenados en función de la p_{adj} .

Tabla 21. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMSP y controles sanos.

Transcrito	Isoforma de procesamiento alternativo	Log ₂ FC	Shrunken Log ₂ FC	p _{adj}	Biotipo
ENST00000527974.5	LGALS8-222	23,83	1,068	4,97E ⁻²⁴	CP (359 aa)
ENST00000426951.5	RBM39-211	26,56	1,253	1,15E ⁻²³	CP (86 aa)
ENST00000490141.5	CEP350-209	22,25	1,209	2,93E ⁻²²	CDS ND
ENST00000244869.3	EREG-201	8,25	5,350	2,02E ⁻²¹	CP (169 aa)
ENST00000265138.4	ARRDC3-201	2,56	2,446	6,34E ⁻²¹	CP (414 aa)
ENST00000401931.2	CXCL8-202	12,15	3,613	6,34E ⁻²¹	CP (95 aa)
ENST00000614459.4	MDM4-215	-25,36	-0,638	3,06E ⁻¹⁹	CP (392 aa)
ENST00000491056.5	IL1B-207	9,97	4,130	6,10E ⁻¹⁹	CDS ND
ENST00000367468.10	PTGS2-201	9,11	4,666	7,01E ⁻¹⁹	CP (604 aa)
ENST00000483500.1	CXCL8-203	10,48	4,008	6,13E ⁻¹⁷	NP (RI)
ENST00000316660.7	PMAIP1-202	5,24	4,228	5,01E ⁻¹⁶	CP (54 aa)
ENST00000263341.7	IL1B-201	10,11	3,513	1,25E ⁻¹⁵	CP (269 aa)
ENST00000507603.1	EREG-203	6,93	4,866	5,18E ⁻¹⁵	NP (RI)
ENST00000307407.8	CXCL8-201	11,90	2,654	6,64E ⁻¹⁵	CP (99 aa)
ENST00000490885.6	PTGS2-203	8,86	4,046	8,27E ⁻¹⁵	NP (RI)
ENST00000299502.9	SERPINB2-201	9,31	3,930	8,27E ⁻¹⁵	CP (415 aa)
ENST00000452684.2	SOD2-206	6,58	4,541	8,27E ⁻¹⁵	CP (140 aa)
ENST00000461696.1	ANKRD28-206	4,90	4,010	1,23E ⁻¹⁴	CDS ND
ENST00000477398.1	IL1B-205	9,98	3,595	1,88E ⁻¹⁴	NP (RI)
ENST00000622226.1	PDLIM2-220	-2,08	-1,986	2,48E ⁻¹⁴	NP (RI)
ENST00000395761.4	CXCL1-201	9,38	3,984	2,59E ⁻¹⁴	CP (107 aa)
ENST00000496280.5	IL1B-208	8,35	4,029	2,59E ⁻¹⁴	NP (RI)
ENST00000489732.1	NAMPT-212	4,96	3,876	2,59E ⁻¹⁴	NP (RI)
ENST00000602540.5	PHLDA1-202	6,36	4,502	2,59E ⁻¹⁴	CP (260 aa)
ENST00000511669.1	CXCL3-204	8,57	4,270	1,01E ⁻¹³	CDS ND
ENST00000326505.4	B3GNT5-201	5,52	4,189	1,11E ⁻¹³	CP (378 aa)
ENST00000367029.5	G0S2-201	7,20	3,980	4,15E ⁻¹³	CP (103 aa)
ENST00000495528.1	VIM-207	3,76	3,285	4,23E ⁻¹³	NP (RI)
ENST00000487639.1	IL1B-206	8,08	3,937	5,79E ⁻¹³	NP (RI)
ENST00000453412.1	RBKS-203	5,76	4,043	7,06E ⁻¹³	NP (NMD)
ENST00000460850.1	ETV3-203	5,11	3,749	8,50E ⁻¹³	CDS ND
ENST00000267015.4	GPR84-201	6,22	4,088	8,50E ⁻¹³	CP (396 aa)
ENST00000323441.10	HIF1A-201	3,76	3,215	1,02E ⁻¹²	CP (735 aa)
ENST00000590596.1	PMAIP1-203	4,79	3,862	1,03E ⁻¹²	NP (RI)
ENST00000613922.2	CCL3-204	9,24	3,406	1,06E ⁻¹²	CP (92 aa)
ENST00000522926.1	TNIP1-216	6,96	4,363	1,14E ⁻¹²	CDS ND
ENST00000621626.1	CCL4-203	7,88	3,991	1,31E ⁻¹²	CP (52 aa)
ENST00000492125.1	KLF6-205	2,79	2,571	1,35E ⁻¹²	CDS ND
ENST00000374379.9	CLIC4-201	3,16	2,834	1,49E ⁻¹²	CP (253 aa)
ENST00000326786.4	ETV3-201	3,98	3,388	1,49E ⁻¹²	CP (143 aa)
ENST00000541010.5	DNAJB5-209	5,90	4,438	1,63E ⁻¹²	NP (RI)
ENST00000394054.6	NFKBIZ-203	4,08	3,445	1,63E ⁻¹²	CP (618 aa)

ENST00000463660.1	GBP2-202	3,41	3,048	1,71E ⁻¹²	NP (RI)
ENST00000311946.8	NIPAL4-201	5,14	3,913	1,99E ⁻¹²	CP (404 aa)
ENST00000594364.1	PLAUR-208	4,57	3,629	2,00E ⁻¹²	NP (RI)
ENST00000315367.4	PLEKHF2-201	2,22	2,105	2,20E ⁻¹²	CP (249 aa)
ENST00000377104.4	SPRY2-202	6,00	4,14	2,55E ⁻¹²	CP (315 aa)
ENST00000371826.4	IFIT2-201	7,11	4,326	3,63E ⁻¹²	CP (472 aa)
ENST00000483863.2	PDE4B-208	3,62	3,090	4,47E ⁻¹²	NP (RI)
ENST00000526084.1	CYB5R2-206	5,66	4,056	4,58E ⁻¹²	NP (RI)

Biotipos: CP: codifica proteína; NP: no codifica proteína; RI: retención de intrón; CDS ND: CDS no definido; NMD: degradación del ARNm mediada por codones STOP. Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos de la proteína para la que codifica.

Al igual que en las comparaciones previas, dentro de las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMRR y controles sanos, la mayoría de ellas estaban sobreexpresadas en los pacientes. Sin embargo, los pacientes presentan una menor expresión génica de la variante 215 de la proteína de unión a p53-homólogo humano de Mouse Double Minute 4 (MDM4-215) y la isoforma 220 de la proteína 2 con dominios PDZ y LIM (PDLIM2-220). Esta última también se encontraba infraexpresada en pacientes EMRR.

Enriquecimiento de rutas de la expresión diferencial entre los grupos EMSP y HC

En la comparación entre el grupo de pacientes con EMSP y HC había 7776 isoformas diferencialmente expresadas, correspondientes a 4508 genes. Esta enorme cantidad de entradas no las recoge la plataforma STRING, por lo que tuvimos que analizarlas directamente en Cytoscape con la stringApp y se obtuvo una red con 8258 interacciones proteína-proteína y un coeficiente promedio de clustering de 0,285, que refleja una cohesión local algo baja.

Resultados

Con la aplicación MCODE se formaron 74 clústeres y se seleccionaron los 6 primeros en función de su valor de score (Figura 40).

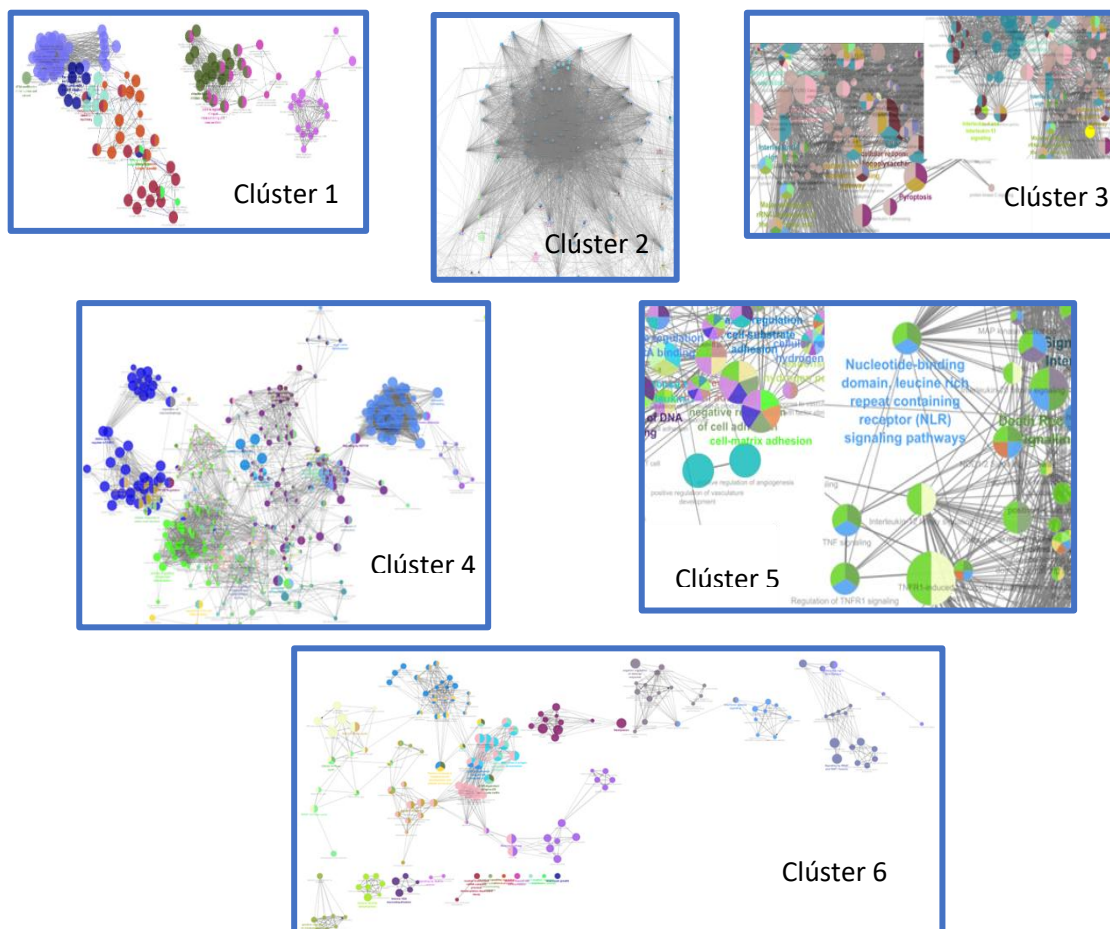


Figura 40. Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante rutas Reactome para las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas entre pacientes con EMSP y pacientes con HC. Cada nodo representa un término Reactome.

Los clústeres 2 al 6 resultaron con cientos de rutas *Reactome*, lo que dificultó su manejo. Las rutas se muestran en las Tablas suplementarias 14 a la 19 del Anexo II. Para los clústeres 2 al 6 se muestran únicamente las 30 rutas más significativamente enriquecidas.

Clúster 1: 96 nodos, 4.156 interacciones y score = 87,49. Rutas: *Metabolismo de ARN, Desarrollo del sistema nervioso, Ruta principal del procesamiento de ARNr en el nucleolo y el citosol, Respuesta celular al estrés.*

Clúster 2: 214 nodos, 3.529 interacciones y score = 33,08. Rutas: *Señalización de citoquinas en el sistema inmunitario, Señalización de interleucina-1, Muerte celular*

programada, Vías de señalización del receptor que contiene un dominio de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (NLR).

Clúster 3: 146 nodos, 2.257 interacciones y score = 31,13. Rutas: *Regulación del ciclo celular mitótico, Replicación del ADN, Señalización de la interleucina-4 e interleucina-15, Piroptosis.*

Clúster 4: 122 nodos, 1.062 interacciones y score = 17,55. Rutas: *Señalización de interleucina-1, Activación de NF- κ B mediada por FCER1, Señalización por interleucinas, Escape del promotor por ARN polimerasa II.*

Clúster 5: 116 nodos, 639 interacciones y score = 11,11. Rutas: *Señalización por receptores nucleares, Autofagia, Senescencia celular, Senescencia inducida por daño en el ADN o estrés en telómeros.*

Clúster 6: 116 nodos, 575 interacciones y score = 10,00. Rutas: *Presentación de antígenos por MHC clase II, Tráfico de membranas, Transporte mediado por vesículas, Señalización por interferón gamma.*

4.3.3.b.III. Diferencias de expresión de las isoformas de procesamiento alternativo entre pacientes con EMPP y HC

Cuando se analizaron por forma clínica, los pacientes con EMPP mostraron 48 VED frente a controles sanos (22 infraexpresadas y 26 sobreexpresadas).

El mapa de calor correspondiente a esta comparación reveló un patrón de expresión génica diferencial con características distintas a las observadas en otros fenotipos de EM (Figura 41). Como sólo había 48 isoformas diferencialmente expresadas según los criterios establecidos, para la generación del mapa de calor con las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial se eligieron las dos isoformas con $\text{Shrunken Log}_2 \text{FC} \geq |0,581|$ y con el nivel de significación más alto inmediatamente posterior ($p_{\text{adj}} = 0,0501$). Aproximadamente la mitad de las isoformas presentaron una marcada sobreexpresión en EMPP mientras que la otra mitad estaban sobreexpresadas en los controles sanos.

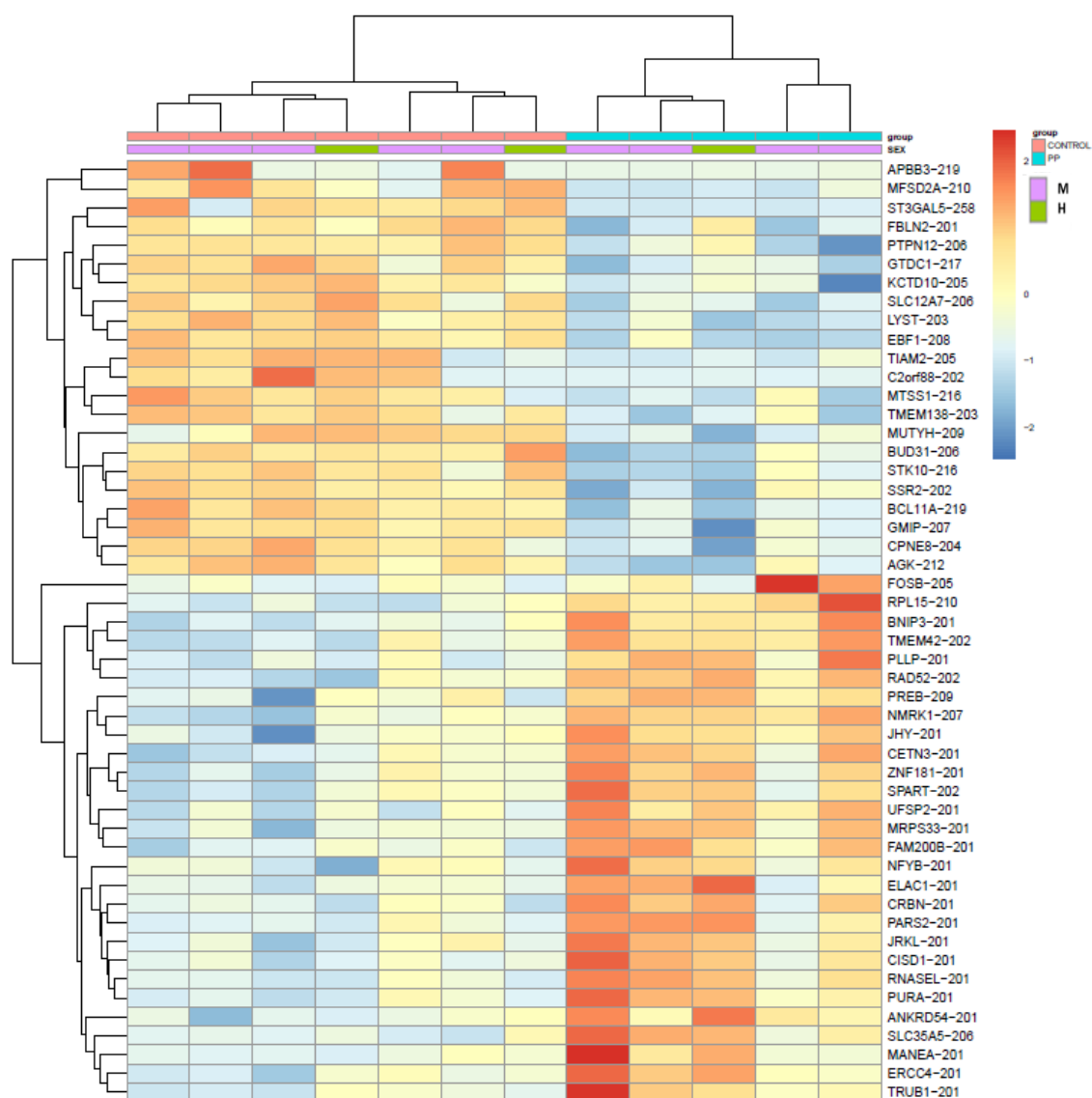


Figura 41. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMPP y controles sanos. EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva, M: mujer, H: hombre

Se identificaron varias isoformas con niveles elevados de expresión en los pacientes EMPP, como *FOSB-205*, *RPL15-210*, *RNASEL-201*, *ELAC1-201* o *PURA-201* relacionados con la regulación de la neurogénesis y patologías del desarrollo neurológico neurodegenerativas y, en menor medida, en procesos inflamatorios. Por el contrario, las isoformas de procesamiento alternativo de genes como *AGK-212*, *BCL11A-219*, *PTPN12-206*, *LYST-203*, *SLC12A7-206* o *MUTYH-209* relacionados con el metabolismo lipídico, el desarrollo cerebral, la movilidad celular, el sistema inmune innato y la reparación del

DNA por daño oxidativo, se encontraron sobreexpresadas en los controles sanos (Tabla 22).

Tabla 22. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMPP y controles sanos

Transcrito	Isoforma de procesamiento alternativo	Log ₂ FC	Shrunken Log ₂ FC	p _{adj}	Biotipo
ENST00000586113.1	FOSB-205	4,03	2,918	5,00E-05	NP (RI)
ENST00000367559.7	RNASEL-201	1,11	1,080	6,30E-04	CP (741 aa)
ENST00000640425.1	ST3GAL5-258	-8,81	-1,173	1,07E-03	NP (NMD)
ENST00000466798.1	BUD31-206	-0,95	-0,924	1,11E-03	NP (RI)
ENST00000546603.5	CPNE8-204	-2,87	-2,184	2,80E-03	CDS ND
ENST00000511896.5	APBB3-219	-7,57	-0,894	3,20E-03	NP (NMD)
ENST00000324787.10	MRPS33-201	1,64	1,514	4,50E-03	CP (106 aa)
ENST00000448481.5	MUTYH-209	-3,29	-2,254	5,20E-03	CP (169 aa)
ENST00000311895.8	ERCC4-201	0,91	0,888	7,13E-03	CP (916 aa)
ENST00000456877.6	TIAM2-205	-5,60	-2,049	1,00E-02	CP (1013 aa)
ENST00000643716.1	BCL11A-219	-1,40	-1,288	1,29E-02	CP (130 aa)
ENST00000484303.5	GTDC1-217	-1,00	-0,967	1,35E-02	NP (RI)
ENST00000524090.5	MTSS1-216	-1,91	-1,684	1,35E-02	CP (645 aa)
ENST00000423772.6	TMEM138-203	-1,22	-1,159	1,49E-02	NP (RI)
ENST00000422728.3	FAM200B-201	0,91	0,888	1,67E-02	CP (857 aa)
ENST00000435495.6	PTPN12-206	-1,36	-1,271	1,83E-02	CP (650 aa)
ENST00000474802.1	PREB-209	1,53	1,402	2,49E-02	NP (RI)
ENST00000368636.9	BNIP3-201	1,05	1,006	2,49E-02	CP (194 aa)
ENST00000647898.1	AGK-212	-1,20	-1,134	2,64E-02	CDS ND
ENST00000215941.9	ANKRD54-201	0,86	0,832	2,64E-02	CP (300 aa)
ENST00000269466.8	ELAC1-201	1,17	1,115	2,64E-02	CP (363 aa)
ENST00000537165.5	KCTD10-205	-1,21	-1,143	2,64E-02	NP (NMD)
ENST00000492406.6	SLC35A5-206	0,78	0,757	2,64E-02	CP (424 aa)
ENST00000264689.11	UFSP2-201	1,12	1,069	2,64E-02	CP (469 aa)
ENST00000591047.1	GMIP-207	-1,67	-1,458	2,64E-02	NP (NMD)
ENST00000240055.8	NFYB-201	1,66	1,501	2,64E-02	CP (207 aa)
ENST00000219207.10	PLLP-201	1,59	1,442	2,96E-02	CP (182 aa)
ENST00000331327.5	PURA-201	1,24	1,164	3,01E-02	CP (322 aa)
ENST00000523615.1	STK10-216	-0,96	-0,926	3,13E-02	NP (RI)
ENST00000634447.1	SLC12A7-206	-3,63	-2,017	3,25E-02	CP (989 aa)
ENST00000358495.8	RAD52-202	0,94	0,904	3,80E-02	CP (418 aa)
ENST00000494066.1	NMRK1-207	1,90	1,648	3,96E-02	NP (NMD)
ENST00000227349.7	JHY-201	1,23	1,145	3,96E-02	CP (778 aa)
ENST00000358812.9	MANEA-201	1,20	1,132	3,98E-02	CP (462 aa)
ENST00000283122.8	CETN3-201	1,53	1,400	4,08E-02	CP (167 aa)
ENST00000392232.7	ZNF181-201	1,48	1,359	4,08E-02	CP (615 aa)
ENST00000462376.2	LYST-203	-1,12	-1,056	4,08E-02	NP (RI)
ENST00000465786.1	RPL15-210	0,70	0,690	4,08E-02	NP (RI)
ENST00000477126.1	TMEM42-202	0,76	0,741	4,15E-02	NP (RI)

Resultados

ENST00000295760.11	FBLN2-201	-1,51	-1,362	4,20E ⁻⁰²	CP (1184 aa)
ENST00000396974.2	C2orf88-202	-6,91	-0,700	4,55E ⁻⁰²	CP (95 aa)
ENST00000438666.7	SPART-202	1,33	1,238	4,60E ⁻⁰²	CP (666 aa)
ENST00000333926.6	CISD1-201	1,40	1,300	4,66E ⁻⁰²	CP (108 aa)
ENST00000332349.5	JRKL-201	1,30	1,216	4,66E ⁻⁰²	CP (524 aa)
ENST00000368311.5	SSR2-202	-1,02	-0,979	4,68E ⁻⁰²	NP (RI)
ENST00000522192.5	EBF1-208	-4,26	-1,847	4,68E ⁻⁰²	NP (RI)
ENST00000231948.9	CRBN-201	1,21	1,140	4,94E ⁻⁰²	CP (442 aa)
ENST00000491515.5	MFSD2A-210	-4,91	-1,339	4,94E ⁻⁰²	CDS ND
ENST00000371279.4	PARS2-201	1,93	1,664	5,01E ⁻⁰²	CP (475 aa)
ENST00000298746.5	TRUB1-201	1,04	0,993	5,01E ⁻⁰²	CP (349 aa)

Biotipos: CP: codifica proteína; NP: no codifica proteína; CDS ND: CDS no definido; RI: retención de intrón; NMD: degradación del ARNm mediada por codones STOP. Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos de la proteína para la que codifica.

Enriquecimiento de rutas de la expresión diferencial entre los grupos EMPP y HC

En el análisis transcriptómico de la comparación entre pacientes con EMPP y HC, se identificaron 48 isoformas diferencialmente expresadas, correspondientes a 48 genes únicos. Estos genes se lanzaron inicialmente en la plataforma STRING, donde se generó una red con sólo 7 interacciones y un coeficiente promedio de clustering de 0,104, lo que sugiere una baja conectividad entre ellos.

Para aumentar la densidad de la red, STRING incorporó términos adicionales que no pertenecían a nuestro conjunto original de genes, lo que permitió formar dos clústeres principales. Sin embargo, al igual que en el análisis proteómico, la mayoría de nuestros genes quedaron excluidos de los nodos centrales de dichos clústeres. Esto limitó la interpretación biológica directa basada exclusivamente en nuestros datos originales. Por este motivo, optamos por utilizar Reactome, sin necesidad de enriquecer artificialmente la red con nodos externos. Esta plataforma sólo aceptó 29 genes, para los cuales identificó cuatro rutas significativamente asociadas con $FDR < 0,05$, (Tabla suplementaria 20) destacando, entre otras: *Reparación por escisión de bases defectuosa asociada con MUTYH*.

4.3.4. OBJETIVO III.b. Identificación de isoformas asociadas a la actividad de la enfermedad

A continuación, se muestran los resultados del análisis comparativo entre las diferentes formas clínicas de la EM.

4.3.4.a. Expresión diferencial de isoformas de procesamiento alternativo en pacientes con EMRR vs. EMSP

Cuando se comparó la expresión génica de las isoformas de procesamiento alternativo entre pacientes con EMRR y EMSP se observaron 855 VED (581 infraexpresadas y 274 sobreexpresadas). Al analizar las 50 variantes con mayor significación estadística en la expresión diferencial en el mapa de calor se evidenció una clara diferenciación de la expresión génica entre los dos grupos (Figura 42).

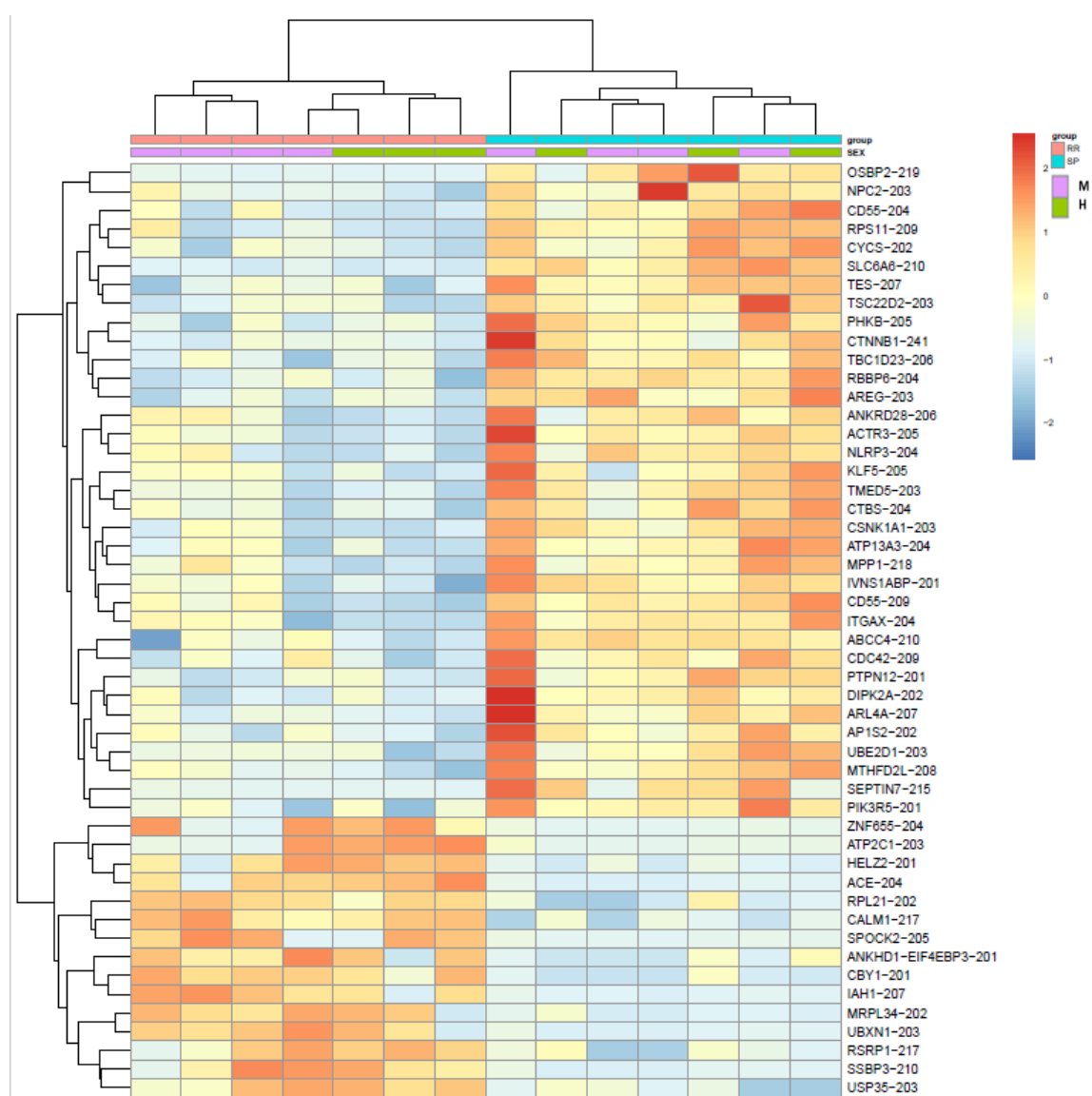


Figura 42. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMRR y EMSP. EMRR: Esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva, M: mujer, H: hombre

Resultados

Algunos genes involucrados en el desarrollo del sistema nervioso, metabolismo de proteínas y la producción de citoquinas antiinflamatorias, como *RPL21A*, *CALM1*, se encontraron sobreexpresados en EMRR y otros involucrados en el sistema inmune innato, como *NLRP3*, estaban sobreexpresados en EMSP (Tabla 23).

Tabla 23. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMRR y EMSP

Transcrito	Isoforma de procesamiento alternativo	Log ₂ FC	Shrunken Log ₂ FC	p _{adj}	Biotipo
ENST00000713559.1	OSBP2-219	-24,56	-0,963	1,18E ⁻²³	CP (460 aa)
ENST00000216029.8	CBY1-201	5,59	3,485	4,26E ⁻⁰⁸	CP (126 aa)
ENST00000311549.11	RPL21-202	1,93	1,806	1,52E ⁻⁰⁶	CP (160 aa)
ENST00000594999.1	MRPL34-202	6,83	2,713	1,52E ⁻⁰⁶	CP (92 aa)
ENST00000622186.5	SLC6A6-210	-10,55	-1,541	3,39E ⁻⁰⁶	CP (620 aa)
ENST00000606483.1	UBE2D1-203	-4,12	-3,200	5,10E ⁻⁰⁶	NP (RI)
ENST00000485009.1	TES-207	-2,78	-2,417	8,55E ⁻⁰⁶	NP (RI)
ENST00000485194.1	ATP13A3-204	-2,71	-2,371	1,06E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000478928.1	ACTR3-205	-1,51	-1,450	1,18E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000663135.1	CALM1-217	2,86	2,436	1,36E ⁻⁰⁵	CP (113 aa)
ENST00000367497.1	IVNS1ABP-201	-2,05	-1,880	2,99E ⁻⁰⁵	CP (135 aa)
ENST00000422190.6	ATP2C1-203	8,25	1,510	7,18E ⁻⁰⁵	CP (939 aa)
ENST00000370082.1	HELZ2-201	6,35	2,314	9,23E ⁻⁰⁵	NP (RI)
ENST00000461101.1	MTHFD2L-208	-1,26	-1,215	1,29E ⁻⁰⁴	CDS ND
ENST00000452655.6	RBBP6-204	-1,25	-1,206	1,39E ⁻⁰⁴	CP (118 aa)
ENST00000428043.5	ACE-204	7,88	1,816	1,39E ⁻⁰⁴	CP (1242 aa)
ENST00000487850.5	IAH1-207	8,08	2,185	2,00E ⁻⁰⁴	CDS ND
ENST00000618707.2	CD55-209	-2,01	-1,799	2,04E ⁻⁰⁴	CP (268 aa)
ENST00000370290.7	TMED5-203	-1,43	-1,364	2,04E ⁻⁰⁴	NP (NMD)
ENST00000437495.1	ANKHD1-EIF4EBP3-201	5,39	1,879	2,04E ⁻⁰⁴	CP (636 aa)
ENST00000525990.1	SSBP3-210	5,40	2,661	2,25E ⁻⁰⁴	CP (101 aa)
ENST00000391827.3	NLRP3-204	-3,85	-2,965	2,38E ⁻⁰⁴	CP (977 aa)
ENST00000541064.5	NPC2-203	-2,89	-2,434	2,94E ⁻⁰⁴	CP (125 aa)
ENST00000635175.1	SEPTIN7-215	-6,04	-2,521	2,99E ⁻⁰⁴	NP (NMD)
ENST00000461696.1	ANKRD28-206	-2,91	-2,362	3,05E ⁻⁰⁴	CDS ND
ENST00000529308.6	USP35-203	1,49	1,404	3,17E ⁻⁰⁴	CP (1018 aa)
ENST00000511560.1	AREG-203	-2,95	-2,422	5,64E ⁻⁰⁴	NP (RI)
ENST00000394163.2	ZNF655-204	8,53	1,105	5,64E ⁻⁰⁴	CP (491 aa)
ENST00000602252.5	RPS11-209	-1,88	-1,705	6,59E ⁻⁰⁴	NP (RI)
ENST00000436354.2	UBXN1-203	6,26	2,204	7,14E ⁻⁰⁴	NP (RI)
ENST00000564873.1	PHKB-205	-1,42	-1,348	7,83E ⁻⁰⁴	CP (73 aa)
ENST00000466814.1	TSC22D2-203	-1,28	-1,228	7,94E ⁻⁰⁴	CP (204 aa)
ENST00000484231.1	TBC1D23-206	-2,08	-1,866	9,18E ⁻⁰⁴	NP (RI)
ENST00000463279.6	SPOCK2-205	9,47	0,955	1,01E ⁻⁰³	CDS ND
ENST00000269300.8	PIK3R5-201	-2,51	-2,223	1,06E ⁻⁰³	NP (NMD)
ENST00000441925.2	DIPK2A-202	-1,78	-1,642	1,06E ⁻⁰³	CP (192 aa)

ENST00000409409.5	CYCS-202	-1,76	-1,610	1,06E ⁻⁰³	CP (105 aa)
ENST00000539231.5	KLF5-205	-2,78	-2,281	1,08E ⁻⁰³	CP (366 aa)
ENST00000367064.9	CD55-204	-2,32	-1,994	1,08E ⁻⁰³	CP (381 aa)
ENST00000477677.5	CTBS-204	-1,06	-1,024	1,29E ⁻⁰³	CDS ND
ENST00000643816.1	ABCC4-210	-2,03	-1,803	1,34E ⁻⁰³	NP (RI)
ENST00000568254.5	RSRP1-217	1,96	1,732	1,45E ⁻⁰³	NP (NMD)
ENST00000248594.11	PTPN12-201	-1,68	-1,554	1,47E ⁻⁰³	CP (780 aa)
ENST00000645320.1	CTNNB1-241	-1,30	-1,237	1,90E ⁻⁰³	CP (781 aa)
ENST00000562918.5	ITGAX-204	-1,76	-1,585	2,15E ⁻⁰³	CP (181 aa)
ENST00000494170.1	MPP1-218	-2,28	-1,919	2,16E ⁻⁰³	NP (RI)
ENST00000503350.6	CSNK1A1-203	-1,64	-1,507	2,19E ⁻⁰³	CP (167 aa)
ENST00000651779.1	ARL4A-207	-1,54	-1,437	2,19E ⁻⁰³	CP (200 aa)
ENST00000380291.5	AP1S2-202	-1,52	-1,415	2,32E ⁻⁰³	CP (160 aa)
ENST00000570088.1	IRF8-211	-1,97	-1,783	2,39E ⁻⁰³	NP (RI)

Biotipos: CP: codifica proteína; NP: no codifica proteína; CDS ND: CDS no definido; RI: retención de intrón; NMD: degradación del ARNm mediada por codones STOP. Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos de la proteína para la que codifica.

Enriquecimiento de rutas de la expresión diferencial entre los grupos EMRR vs. EMSP.

Como hemos indicado, se observaron 855 isoformas con expresión diferencial significativa, correspondientes a 707 genes. Se lanzaron estos genes a la plataforma STRING y se obtuvo una red con 3254 interacciones, un valor de enriquecimiento proteína-proteína $p < 1,0E^{-16}$ y un coeficiente promedio de clustering de 0,382, por tanto, módulos o grupos bastante marcados. (Figura 43)

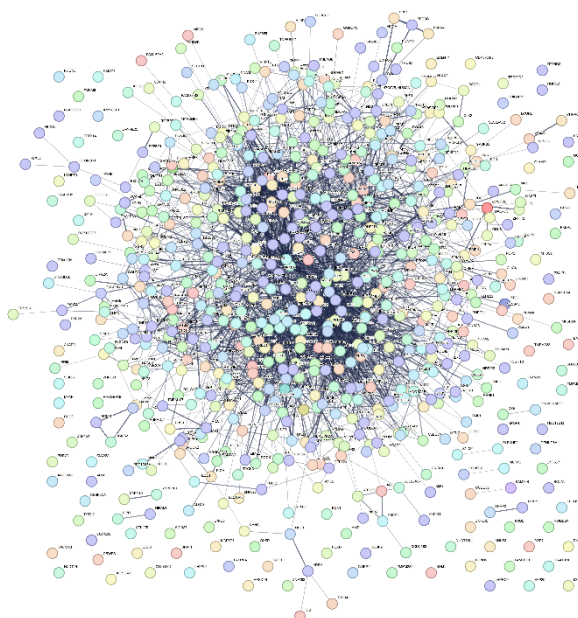


Figura 43. Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING, correspondiente a las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con EMRR y con EMSP

Resultados

Las proteínas correspondientes a las formas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas se introdujeron en el software Cytoscape y se analizaron mediante la aplicación MCODE, que las agrupó en 21 clústeres. Se seleccionaron los 6 con mayor valor de score, que se representan en la Figura 43.

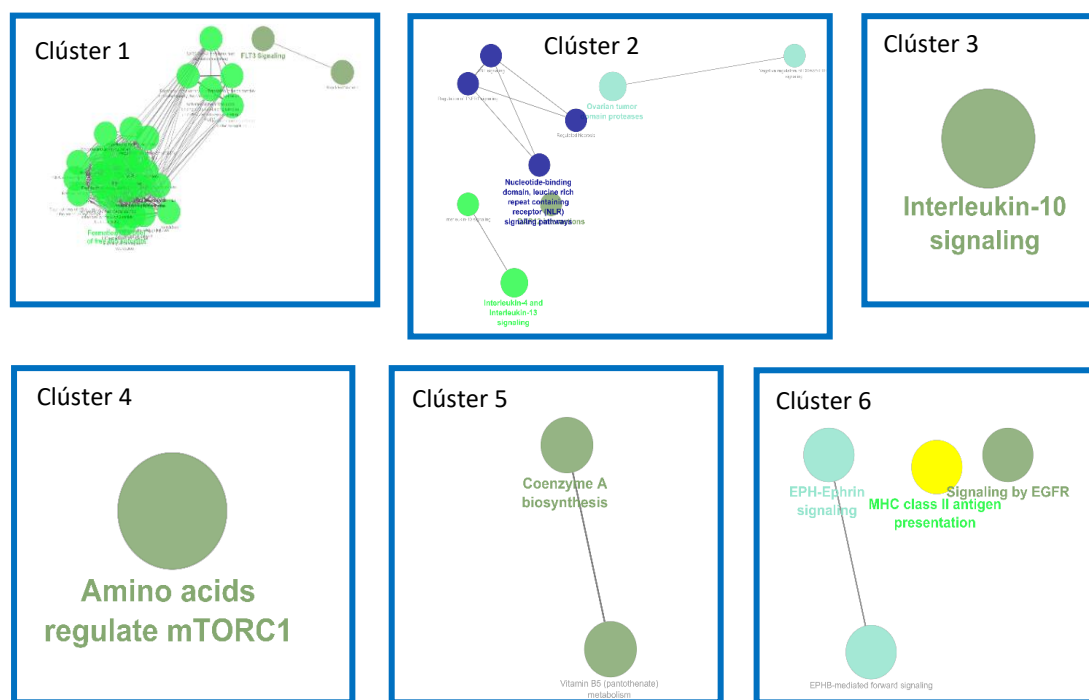


Figura 44, Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante rutas Reactome para las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas entre pacientes con EMRR y pacientes con EMSP. Cada nodo representa un término Reactome.

Las rutas *Reactome* diferencialmente enriquecidas ($p_{adj} < 0,01$) en cada clúster se recogen en las Tablas suplementarias 21 a la 26 (Anexo II) y se engloban en las siguientes rutas generales.

Clúster 1: 24 nodos, 175 interacciones y score = 15,22. Rutas: *Formación del complejo de inicio de la traducción, Metabolismo de ARN por degradación mediada por codón de terminación prematuro NMD (nonsense mediated decay) dependiente y no dependiente del complejo de unión de exones, Procesamiento del ARNr.*

Clúster 2: 41 nodos, 204 interacciones y score = 10,20. Rutas: *Señalización en el sistema inmune por citoquinas IL1, IL4, IL13 e IL12, Señalización de TNF.*

Clúster 3: 32 nodos, 86 interacciones y score = 8,19. Rutas: *Señalización en el sistema inmune por IL10.*

Clúster 4: 5 nodos, 10 interacciones y score = 5,00. Rutas: *Los aminoácidos regulan mTORC1.*

Clúster 5: 4 nodos, 6 interacciones y score = 4,00. Rutas: *Biosíntesis de coenzima A y Metabolismo de la vitamina B5.*

Clúster 6: 21 nodos, 36 interacciones y score = 3,60. Rutas: *Presentación de antígenos por MHC clase II.*

4.3.4.b. Expresión diferencial de isoformas de procesamiento alternativo en pacientes con EMRR vs. EMPP.

Al analizar las variantes de procesamiento alternativo entre pacientes con EMRR y EMPP, se encontraron 1077 VED, de las cuales 109 estaban infraexpresadas y 968 sobreexpresadas.

En el mapa de calor correspondiente a las 50 variantes con mayor significación estadística en la expresión diferencial se observó una marcada heterogeneidad entre los pacientes con EMRR (Figura 44). Los pacientes *naïve*, que no habían recibido tratamiento previo, se agruparon en un extremo, mientras que aquellos muestreados al final del período de lavado se agruparon junto con los pacientes con EMPP.

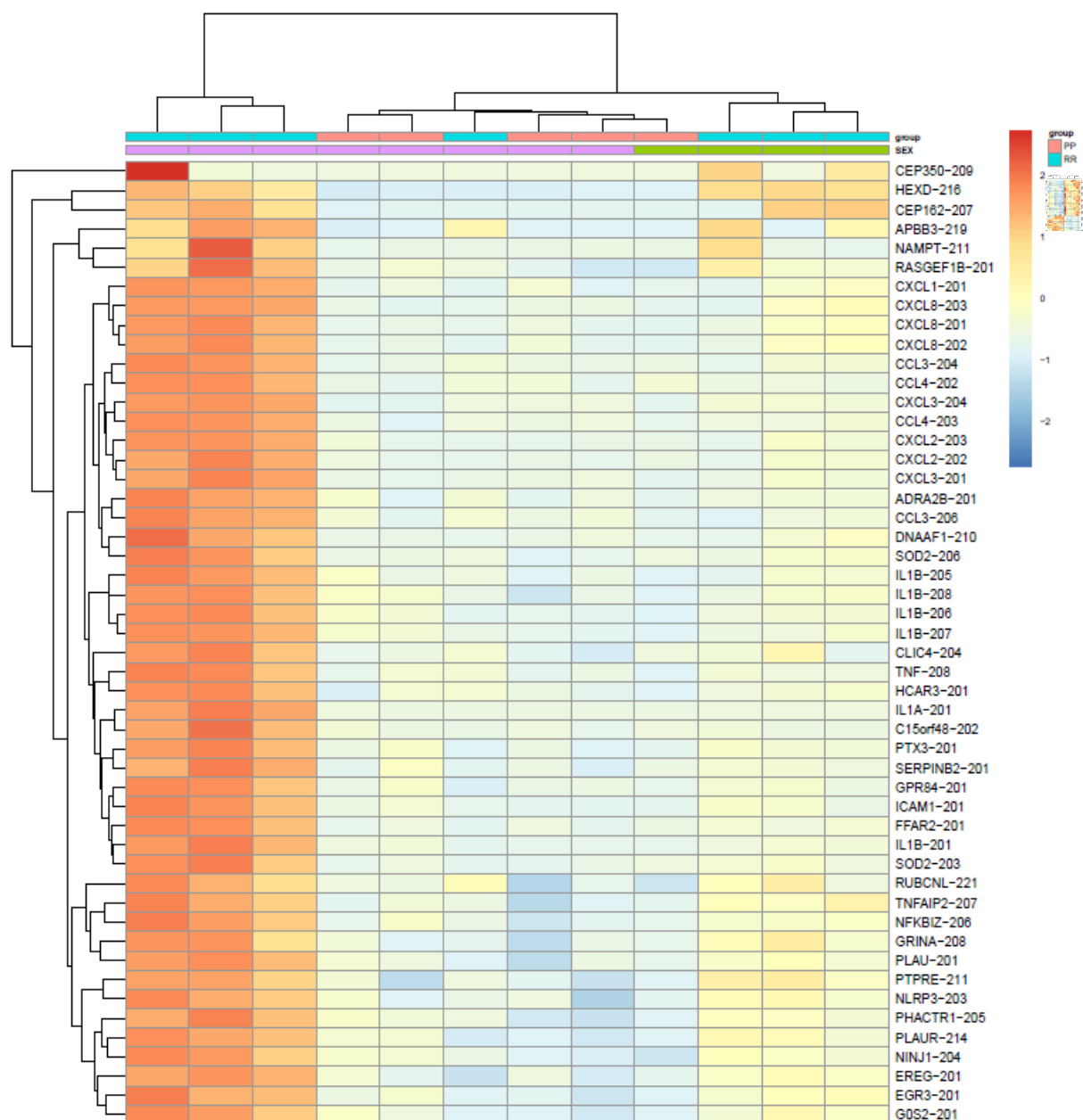


Figura 45. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMRR y EMPP. EMRR: Esclerosis múltiple remitente recurrente, EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva, M: mujer, H: hombre

En esta comparación, se evidenció una firma inflamatoria más pronunciada en el grupo EMRR *naïve*, con una fuerte expresión de isoformas de procesamiento alternativo de genes de quimiocinas y sus ligandos, citoquinas proinflamatorias y moléculas de la vía de señalización del inflamasoma como *CXCL1*, *CXCL8*, *IL1B* y *NLRP3* (Tabla 24).

Tabla 24. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMRR y EMPP.

Transcrito	Isoforma de procesamiento alternativo	Log ₂ FC	Shrunken Log ₂ FC	p _{adj}	Biotipo
ENST00000490141.5	CEP350-209	35,36	0,716	1,57E ⁻⁴⁷	CDS ND
ENST00000644009.1	HEXD-216	26,13	1,123	8,81E ⁻³⁴	CP (486 aa)
ENST00000489358.5	NAMPT-211	25,81	0,753	9,00E ⁻²¹	CP (152 aa)
ENST00000617909.2	CEP162-207	27,08	0,794	3,12E ⁻²⁰	CP (1327 aa)
ENST00000613922.2	CCL3-204	9,52	2,278	2,74E ⁻¹⁰	CP (92 aa)
ENST00000307407.8	CXCL8-201	11,19	1,505	5,08E ⁻¹⁰	CP (99 aa)
ENST00000263341.7	IL1B-201	9,20	2,346	6,02E ⁻¹⁰	CP (269 aa)
ENST00000401931.2	CXCL8-202	9,63	2,294	1,70E ⁻⁰⁹	CP (95 aa)
ENST00000508487.3	CXCL2-202	9,59	1,784	5,71E ⁻⁰⁹	CP (107 aa)
ENST00000483500.1	CXCL8-203	9,11	2,202	1,32E ⁻⁰⁸	NP (RI)
ENST00000511669.1	CXCL3-204	8,53	2,616	1,89E ⁻⁰⁸	CDS ND
ENST00000621626.1	CCL4-203	7,41	2,889	2,88E ⁻⁰⁸	CP (52 aa)
ENST00000263339.4	IL1A-201	14,31	0,927	7,57E ⁻⁰⁸	CP (271 aa)
ENST00000317216.3	EGR3-201	4,98	3,367	1,54E ⁻⁰⁷	CP (387 aa)
ENST00000264400.7	RASGEF1B-201	4,13	3,118	2,17E ⁻⁰⁷	CP (473 aa)
ENST00000367029.5	G0S2-201	6,26	3,263	2,49E ⁻⁰⁷	CP (103 aa)
ENST00000533044.5	GRINA-208	4,21	3,172	4,82E ⁻⁰⁷	CP (108 aa)
ENST00000449264.3	TNF-208	5,15	3,407	5,49E ⁻⁰⁷	CP (233 aa)
ENST00000620793.2	ADRA2B-201	6,46	3,190	5,81E ⁻⁰⁷	CP (450 aa)
ENST00000295927.4	PTX3-201	5,43	3,195	8,10E ⁻⁰⁷	CP (381 aa)
ENST00000623406.1	DNAAF1-210	10,24	1,549	1,16E ⁻⁰⁶	TEC
ENST00000296026.4	CXCL3-201	10,77	1,032	1,19E ⁻⁰⁶	CP (107 aa)
ENST00000510048.1	CXCL2-203	8,66	2,070	1,74E ⁻⁰⁶	NP (RI)
ENST00000560562.5	TNFAIP2-207	4,88	3,375	1,83E ⁻⁰⁶	NP (NMD)
ENST00000613922.2	CCL3-204	6,08	2,950	2,01E ⁻⁰⁶	CP (92 aa)
ENST00000495530.5	PTPRE-211	5,22	2,952	2,28E ⁻⁰⁶	NP (NMD)
ENST00000452684.2	SOD2-206	5,00	3,354	3,30E ⁻⁰⁶	CP (140 aa)
ENST00000511896.5	APBB3-219	9,29	1,566	3,35E ⁻⁰⁶	NP (NMD)
ENST00000601723.5	PLAUR-214	4,68	3,078	3,91E ⁻⁰⁶	CP (286 aa)
ENST00000395761.4	CXCL1-201	7,38	2,088	3,96E ⁻⁰⁶	CP (107 aa)
ENST00000615863.2	CCL4-202	6,06	2,899	4,70E ⁻⁰⁶	CP (82 aa)
ENST00000246549.2	FFAR2-201	4,98	3,250	4,70E ⁻⁰⁶	CP (330 aa)
ENST00000372764.4	PLAU-201	5,71	2,886	6,07E ⁻⁰⁶	CP (431 aa)
ENST00000489274.1	NINJ1-204	3,32	2,653	6,52E ⁻⁰⁶	CDS ND
ENST00000477601.1	NFKBIZ-206	4,42	3,131	6,74E ⁻⁰⁶	CP (130 aa)
ENST00000528880.3	HCAR3-201	3,86	2,957	6,98E ⁻⁰⁶	CP (387 aa)
ENST00000497755.1	CLIC4-204	4,17	3,052	7,03E ⁻⁰⁶	CDS ND
ENST00000396650.7	C15orf48-202	6,66	2,705	7,06E ⁻⁰⁶	CP (83 aa)
ENST00000299502.9	SERPINB2-201	6,86	2,379	7,10E ⁻⁰⁶	CP (451 aa)
ENST00000487639.1	IL1B-206	6,43	2,729	7,62E ⁻⁰⁶	NP (RI)
ENST00000491056.5	IL1B-207	6,47	2,711	8,33E ⁻⁰⁶	CDS ND

Resultados

ENST00000244869.3	EREG-201	5,02	2,945	9,52E-06	CP (169 aa)
ENST00000366496.7	NLRP3-203	5,91	2,812	1,03E-05	CP (977 aa)
ENST00000477398.1	IL1B-205	7,37	2,280	1,06E-05	NP (RI)
ENST00000367055.8	SOD2-203	4,55	3,072	1,13E-05	CP (222 aa)
ENST00000496280.5	IL1B-208	6,16	2,753	1,27E-05	NP (RI)
ENST00000267015.4	GPR84-201	4,82	3,163	1,34E-05	CP (396 aa)
ENST00000379350.5	PHACTR1-205	3,76	2,828	1,40E-05	NP (RI)
ENST00000676114.1	RUBCNL-221	2,31	2,046	1,44E-05	CP (662 aa)
ENST00000264832.8	ICAM1-201	3,79	2,881	1,48E-05	CP (532 aa)

Biotipos: CP: codifica proteína; NP: no codifica proteína; CDS ND: CDS no definido; RI: retención de intrón; NMD: degradación del ARNm mediada por codones STOP; TEC: Transcritos por confirmar experimentalmente Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos de la proteína para la que codifica.

Enriquecimiento de rutas de la expresión diferencial entre los grupos EMRR y EMPP

En el análisis transcriptómico de la comparación entre pacientes con EMRR y EMPP, se observaron 1077 isoformas con expresión diferencial significativa, correspondientes a 733 genes. El coeficiente promedio de clustering resultó bastante marcado (0,404) y el valor del enriquecimiento proteína-proteína fue de $p < 1,0E^{-16}$ (Figura 46)

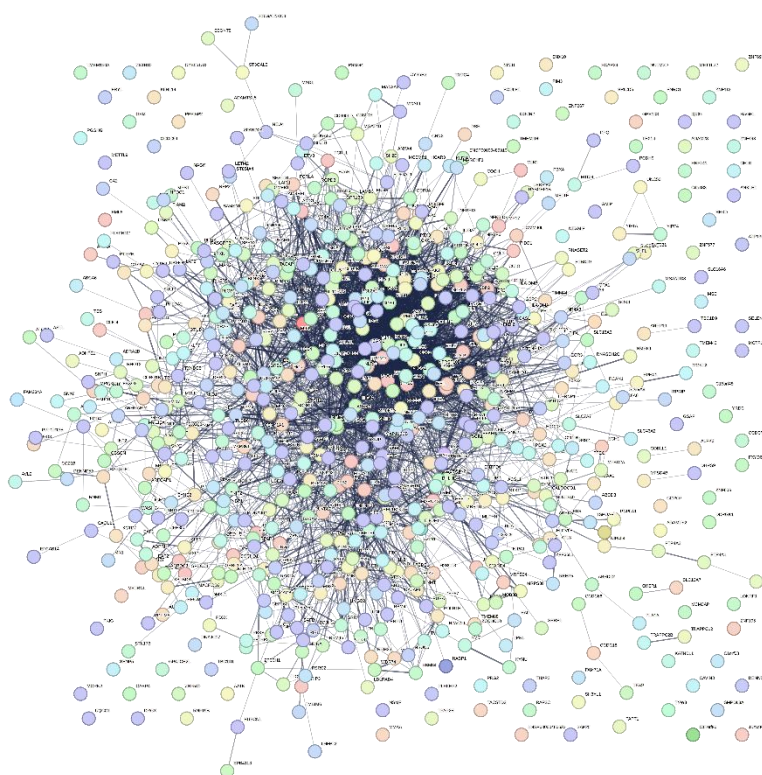


Figura 46. Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING, correspondiente a las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con EMRR y con EMPP

Se lanzaron estas proteínas a la plataforma Cytoscape y se obtuvo una red con 4660 interacciones, 27 clústeres. Sin embargo, sólo se encontraron rutas en las plataformas *Reactome* o GeneOntology para 4 de ellos (Figura 47).

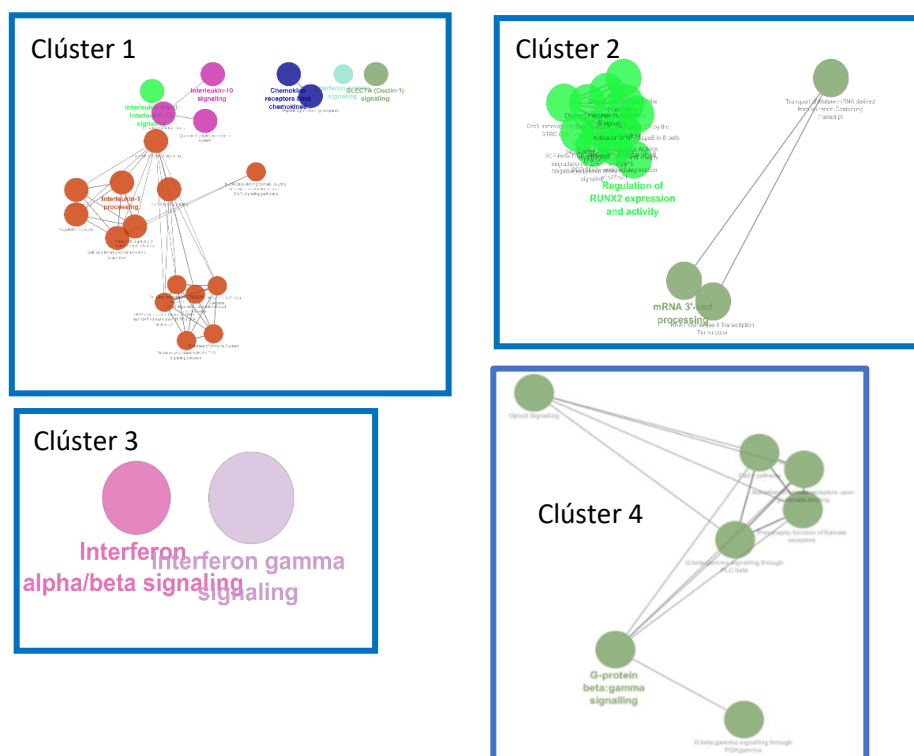


Figura 47. Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante rutas Reactome para las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas entre pacientes con EMRR y pacientes con EMPP. Cada nodo representa un término Reactome.

Las rutas *Reactome* diferencialmente enriquecidas este caso con $FDR \leq 0,05$, en cada clúster se recogen en las Tablas suplementarias 27 a 30 (Anexo II) y se engloban en las siguientes rutas generales.

Clúster 1: 42 nodos, 721 interacciones y score = 35,17. Rutas: *Enfermedades del sistema inmune asociadas a la cascada de señalización TLR*, *Señalización en el sistema inmune por interleucinas IL1, IL4, IL13 e IL10*, *Muerte celular programada por Piroptosis*.

Clúster 2: 17 nodos, 42 interacciones y score = 5,25. Rutas: *Respuesta celular a estímulos, Transcripción, Metabolismo del ARN y splicing de ARNm, Metabolismo de proteínas, Muerte celular programada, Activación de NF-kB en células B.*

Clúster 3: 24 nodos, 48 interacciones y score = 4,17. Rutas: *Sistema inmune, señalización por interferón alpha, beta, gamma.*

Clúster 4: 7 nodos, 18 interacciones y score = 4,00. Rutas: *Señalización de la subunidad beta:gamma de la proteína G.*

4.3.4.c. Expresión diferencial de isoformas de procesamiento alternativo en pacientes con EMSP vs. EMPP.

Al analizar las variantes de procesamiento alternativo entre pacientes con ambas formas progresivas, se encontraron 10.953 VED (4694 infraexpresadas y 6259 sobreexpresadas).

En el mapa de calor correspondiente a las 50 variantes con mayor significación estadística en la expresión diferencial se observó una separación muy clara entre ambos fenotipos progresivos (Figura 48).

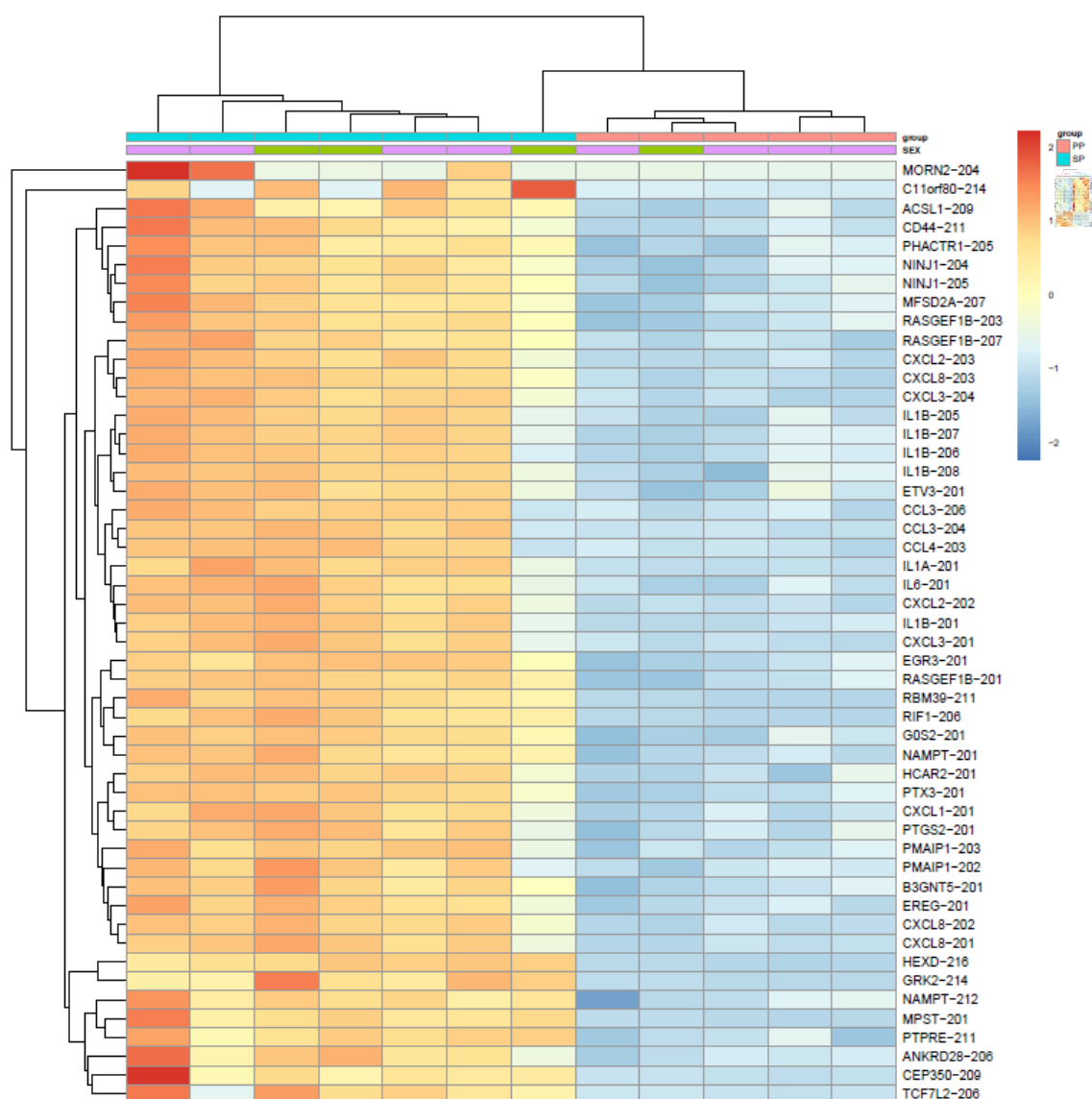


Figura 48. Mapa de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EMSP y EMPP. EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva, EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva M: mujer, H: hombre

Curiosamente, los pacientes con EMSP mostraron una sobreexpresión con respecto a aquellos con EMPP de isoformas de procesamiento alternativo de la citoquina proinflamatoria IL1 β y de los ligandos de quimiocinas, tanto de isoformas codificantes de proteína (IL1 β -201, CXCL1-201, CXCL2-202, CXCL3-201, CXCL8-201, CXCL8-202, CCL3-204 y CCL4-203) como de no codificantes (IL1 β -205, IL1 β -206, IL1 β -207, IL1 β -208, CXCL2-203, CXCL3-204, CXCL8-203 y CCL3-204), (Tabla 25).

Tabla 25. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con EMSP y EMPP

Transcrito	Isoforma de procesamiento alternativo	Log ₂ FC	Shrunken Log ₂ FC	p _{adj}	Biotipo
ENST00000490141.5	CEP350-209	36,39	1,052	1,80E ⁻⁵⁰	CDS ND
ENST00000426951.5	RBM39-211	36,77	1,140	3,01E ⁻³⁸	CP (86 aa)
ENST00000644009.1	HEXD-216	26,09	1,156	9,31E ⁻³⁴	CP (486 aa)
ENST00000401931.1	CXCL8-202	14,03	3,216	5,34E ⁻²²	CP (95 aa)
ENST00000534651.5	GRK2-214	26,16	0,999	1,47E ⁻²¹	NP (RI)
ENST00000307407.8	CXCL8-201	15,40	2,358	1,02E ⁻²⁰	CP (99 aa)
ENST00000483500.1	CXCL8-203	13,43	3,702	1,02E ⁻²⁰	NP (RI)
ENST00000341116.7	MPST-201	25,49	1,517	2,31E ⁻²⁰	CP (297 aa)
ENST00000453091.6	RIF1-206	30,53	0,880	1,43E ⁻¹⁹	CP (244 aa)
ENST00000263341.7	IL1B-201	12,14	3,150	7,28E ⁻¹⁹	CP (289 aa)
ENST00000244869.3	EREG-201	8,41	5,094	2,26E ⁻¹⁸	CP (169 aa)
ENST00000511669.1	CXCL3-204	11,94	4,105	2,30E ⁻¹⁸	CDS ND
ENST00000263339.4	IL1A-201	20,34	1,377	1,07E ⁻¹⁷	CP (271 aa)
ENST00000508487.3	CXCL2-202	12,73	2,942	2,26E ⁻¹⁷	CP (107 aa)
ENST00000296026.4	CXCL3-201	16,21	2,082	4,50E ⁻¹⁷	CP (107 aa)
ENST00000613922.2	CCL3-204	11,69	3,056	6,75E ⁻¹⁷	CP (92 aa)
ENST00000355995.8	TCF7L2-206	28,11	0,635	1,05E ⁻¹⁶	CP (619 aa)
ENST00000326505.4	B3GNT5-201	6,58	4,608	4,36E ⁻¹⁶	CP (378 aa)
ENST00000395761.4	CXCL1-201	11,09	3,666	9,23E ⁻¹⁶	CP (107 aa)
ENST00000491056.5	IL1B-207	10,01	3,762	9,89E ⁻¹⁶	CDS ND
ENST00000532565.6	C11orf80-214	19,98	0,725	1,09E ⁻¹⁵	CP (459 aa)
ENST00000317216.3	EGR3-201	6,78	4,481	1,13E ⁻¹⁵	CP (367 aa)
ENST00000316660.7	PMAIP1-202	5,66	4,316	1,38E ⁻¹⁵	CP (54 aa)
ENST00000621626.1	CCL4-203	9,65	3,801	1,52E ⁻¹⁵	CP (52 aa)
ENST00000477398.1	IL1B-205	11,35	3,296	2,06E ⁻¹⁵	NP (RI)
ENST00000509081.5	RASGEF1B-207	4,18	3,588	2,06E ⁻¹⁵	CP (472 aa)
ENST00000510048.1	CXCL2-203	12,38	3,312	3,98E ⁻¹⁵	NP (RI)
ENST00000480630.5	MFS2A-207	5,25	4,121	6,61E ⁻¹⁵	CDS ND
ENST00000442151.6	CD44-211	5,41	4,217	9,74E ⁻¹⁵	CP (294 aa)
ENST00000367029.5	G0S2-201	8,28	3,947	2,10E ⁻¹⁴	CP (103 aa)
ENST0000040014.5	MORN2-204	23,08	0,591	2,28E ⁻¹⁴	CP (79 aa)
ENST00000328880.6	HCAR2-201	5,73	4,184	2,28E ⁻¹⁴	CP (363 aa)
ENST00000379350.5	PHACTR1-205	5,63	4,241	2,72E ⁻¹⁴	NP (RI)
ENST00000379350.5	ACSL1-209	4,49	3,747	2,72E ⁻¹⁴	NP (RI)
ENST00000489274.1	NINJ1-204	4,79	3,809	3,68E ⁻¹⁴	CDS ND
ENST00000264400.6	RASGEF1B-201	5,39	3,938	3,68E ⁻¹⁴	CP (473 aa)
ENST00000295927.4	PTX3-201	7,34	4,240	3,81E ⁻¹⁴	CP (361 aa)
ENST00000489732.2	NAMPT-212	5,41	4,124	5,11E ⁻¹⁴	NP (RI)
ENST00000258743.10	IL6-201	14,28	2,224	5,32E ⁻¹⁴	CP (212 aa)
ENST00000367468.10	PTGS2-201	8,63	4,166	5,32E ⁻¹⁴	CP (604 aa)
ENST00000487639.1	IL1B-206	9,30	3,737	6,07E ⁻¹⁴	NP (RI)

ENST00000461696.1	ANKRD28-206	5,24	4,151	6,07E ⁻¹⁴	CDS ND
ENST00000496280.5	IL1B-208	9,05	3,752	6,57E ⁻¹⁴	NP (RI)
ENST00000222553.8	NAMPT-201	4,84	3,856	6,57E ⁻¹⁴	CP (491 aa)
ENST00000436139.6	RASGEF1B-203	5,57	4,093	6,57E ⁻¹⁴	CP (210 aa)
ENST00000490564.1	NINJ1-205	4,58	3,688	8,31E ⁻¹⁴	CDS ND
ENST00000613922.2	CCL3-204	8,32	4,114	8,95E ⁻¹⁴	CP (92 aa)
ENST00000590596.1	PMAIP1-203	5,50	4,220	9,98E ⁻¹⁴	NP (RI)
ENST00000326786.4	ETV3-201	4,54	3,681	1,33E ⁻¹³	CP (143 aa)
ENST00000495530.5	PTPRE-211	7,12	4,309	1,37E ⁻¹³	NP (NMD)

Biotipos: CP: codifica proteína; NP: no codifica proteína; CDS ND: CDS no definido; RI: *retención de intrón*; NMD: degradación del ARNm mediada por codones STOP; Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos de la proteína para la que codifica.

Enriquecimiento de rutas de la expresión diferencial entre los grupos EMSP *versus* EMPP

En la comparación entre el grupo de pacientes con EMSP y EMPP había 10953 isoformas diferencialmente expresadas, correspondientes a 5832 genes. Al igual que en la comparación EMSP con HC, esta enorme cantidad de entradas no las recoge la plataforma STRING, por lo que tuvimos que analizarlas directamente en Cytoscape con la stringApp y se obtuvo una red con 146.637 interacciones y un coeficiente promedio de clustering de 0,273, con baja cohesión local.

Con la aplicación MCODE se formaron 109 clústeres y se seleccionaron los 6 primeros en función de su valor de score (Figura 49).

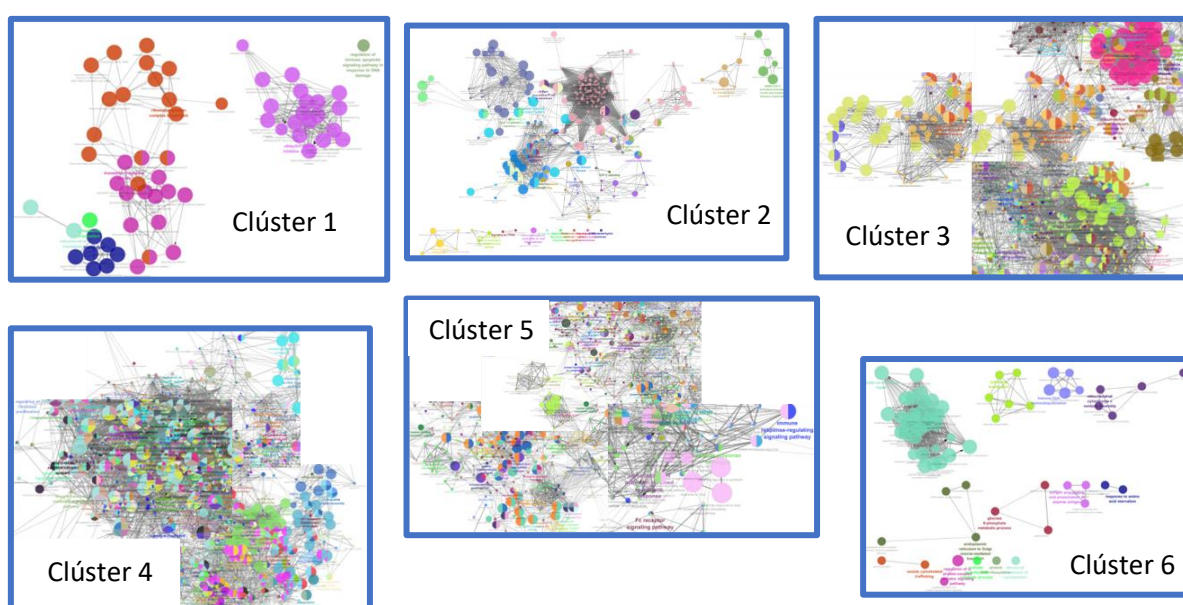


Figura 49. Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante rutas Reactome para las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas entre pacientes con EMSP y pacientes con EMPP. Cada nodo representa un término Reactome.

Los clústeres 2, 3, 4 resultaron con cientos de rutas *Reactome*, que requería un espacio excesivo en las tablas. Por esa razón, en las Tablas suplementarias 31 a 36 del Anexo II se presentan únicamente las 30 rutas más significativamente enriquecidas de cada clúster, y a continuación se detallan algunas de las rutas características de cada clúster.

Clúster 1: 97 nodos, 4.195 interacciones y score = 87,40. Rutas: *Procesamiento de ARNr, Traducción, Degradación mediada por codones sin sentido (NMD), Desarrollo del sistema nervioso.*

Clúster 2: 159 nodos, 1785 interacciones y score = 47,91. Rutas: *Sistema inmunitario, Señalización de interleucina-10, Cascadas de receptores tipo Toll, Señalización de interleucina-1, Muerte celular programada.*

Clúster 3: 260 nodos, 4.244 interacciones y score = 32,77. Rutas: *Splicing de ARNm, Señalización de citoquinas en el sistema inmunitario, Señalización por interleucinas, Señalización de interleucina-1.*

Clúster 4: 323 nodos, 3.849 interacciones y score = 23,91. Rutas: *Expresión génica (transcripción), Vía general de transcripción, Transducción de señales.*

Clúster 5: 423 nodos, 3.826 interacciones y score = 18,13. Rutas: *Tráfico de membranas, Transporte mediado por vesículas, Sistema inmunitario, Señalización por receptores tirosina quinasa.*

Clúster 6: 120 nodos, 429 interacciones y score = 7,21. Rutas: *Presentación de antígenos por MHC clase II, Tráfico de membranas, Transporte mediado por vesículas.*

4.3.5. OBJETIVO III.c. Análisis de expresión génica diferencial entre el grupo de pacientes con otras enfermedades neuroinflamatorias (OIND) y los pacientes con EM

A continuación, se muestran los resultados del análisis comparativo de la expresión diferencial entre pacientes con EM y pacientes con OIND. Una limitación importante de

esta comparación es la diferencia en el tamaño muestral, con solo 2 pacientes con OIND frente a 19 pacientes con EM, lo que dificulta alcanzar significación estadística en muchas de las isoformas analizadas. No obstante, al examinar las variantes de procesamiento alternativo con mayor significación estadística, se observa que los pacientes con EM muestran una baja heterogeneidad, permitiendo su clasificación en dos grupos bien definidos, los cuales se separan claramente del grupo OIND (Figura 50). De las 74.788 isoformas de procesamiento alternativo evaluadas, únicamente 19 cumplieron con los criterios de expresión diferencial establecidos en este estudio ($\text{shrunken Log}_2\text{FC} \geq |0,58|$ y $p_{\text{adj}} < 0,05$). Para construir el mapa de calor de las 50 variantes más significativas, se seleccionaron aquellas isoformas con los valores más altos de $\text{shrunken Log}_2\text{FC}$ y valores de $p < 0,0003$, incluso si el valor de p_{adj} no alcanzaba el umbral de significación de 0,05.

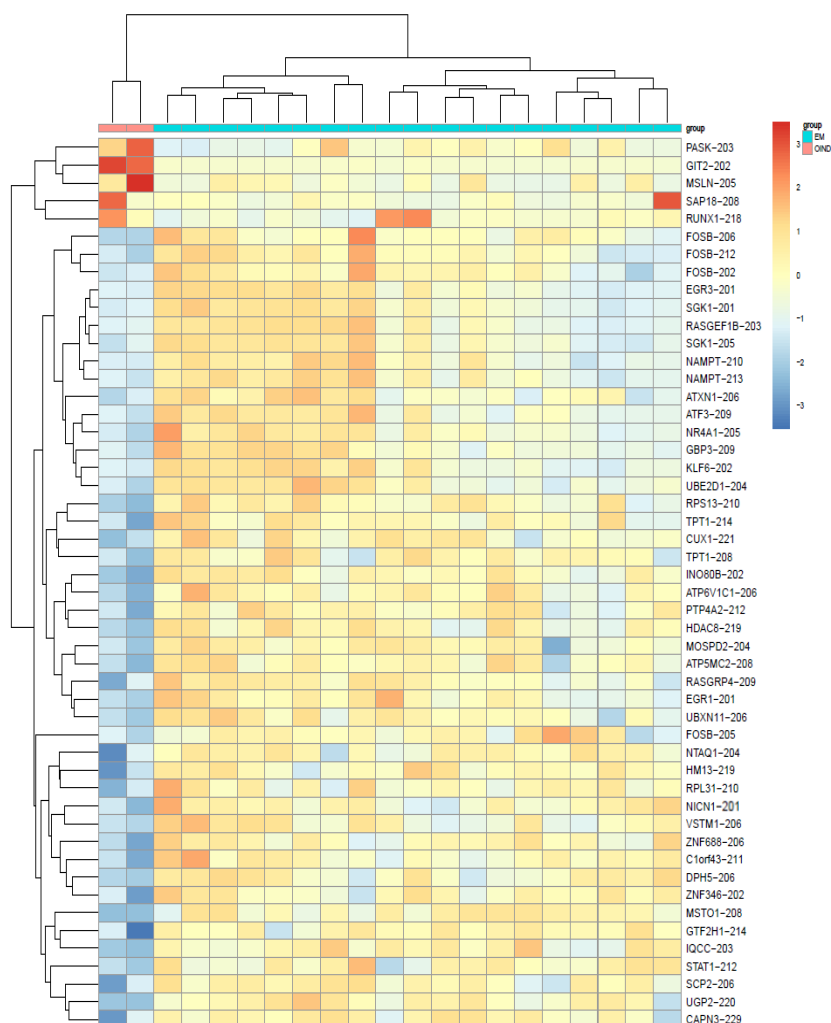


Figura 50. Mapas de calor de las 50 variantes de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial en la comparación entre pacientes con EM y OIND. OIND: otras enfermedades neurológicas inflamatorias. M: mujer, H: hombre.

Algunas de las isoformas de procesamiento alternativo sobreexpresadas en pacientes con EM participan de vías de activación del inflammasoma (*FOSB*, *RPL31* o *STAT1*), de transcripción estimulada por el factor de crecimiento nervioso (NGF) y activación de quinasas y factores de transcripción (*FOSB*, *SGK1*, *EGR1* y *EGR3*), y señalización mediada por interferones (*EGR1*, *STAT1* y *GBP3*). Por otro lado, isoformas procedentes de genes relacionados con la modificación postraduccional (*MSLN*), el metabolismo de la glucosa (*PASK*), transducción de señal (*GIT2*), o vías de transcripción (expresión génica) (*RUNX1* y *SAP18*) estaban sobreexpresadas en el grupo OIND. Este agrupamiento jerárquico permite una clara separación entre ambos grupos, lo que refuerza la idea de que la EM activa rutas moleculares distintas a las de otras enfermedades neurológicas inflamatorias (Tabla 26).

Tabla 26. Las 50 isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor significación estadística en la expresión diferencial entre pacientes con OIND versus pacientes con EM.

Transcrito	Isoforma de procesamiento alternativo	Log ₂ FC	Shrunken Log ₂ FC	p valor	p _{adj}	Biotipo
ENST00000355312.8	GIT2-202	10,366	5,727	1,17E ⁻¹⁶	6,22E ⁻¹²	CP (759 aa)
ENST00000621421.4	SAP18-208	3,654	1,747	2,80E ⁻⁰⁹	7,41E ⁻⁰⁵	CP (172 aa)
ENST00000586615.5	FOSB-206	-5,084	-1,950	1,25E ⁻⁰⁸	2,21E ⁻⁰⁴	CP (288 aa)
ENST00000409493.3	INO80B-202	-3,075	-2,318	3,56E ⁻⁰⁸	4,72E ⁻⁰⁴	CP (207 aa)
ENST00000675419.1	RUNX1-218	3,434	1,365	7,41E ⁻⁰⁸	7,86E ⁻⁰⁴	CP (480 aa)
ENST00000473327.5	MSTO1-208	-7,784	-2,761	7,79E ⁻⁰⁷	4,59E ⁻⁰³	CDS ND
ENST00000487640.5	UGP2-220	-7,663	-2,442	1,89E ⁻⁰⁶	9,13E ⁻⁰³	NMD
ENST00000239938.5	EGR1-201	-4,471	-1,521	4,19 E ⁻⁰⁶	0,017	CP (543 aa)
ENST00000592811.5	FOSB-212	-5,775	-1,032	4,47 E ⁻⁰⁶	0,017	CP (188 aa)
ENST00000534641.5	GTF2H1-214	-3,136	-1,926	8,27 E ⁻⁰⁶	0,029	CP (432 aa)
ENST00000566632.5	ZNF688-206	-2,030	-1,678	8,78 E ⁻⁰⁶	0,029	CP (142 aa)
ENST00000498035.5	HM13-219	-1,748	-1,511	1,22E ⁻⁰⁵	0,036	CP (143 aa)
ENST00000529477.5	PTP4A2-212	-2,706	-1,851	1,41E ⁻⁰⁵	0,038	CDS ND
ENST00000317216.3	EGR3-201	-6,456	-0,733	1,62E ⁻⁰⁵	0,041	CP (367 aa)
ENST00000617816.1	IQCC-203	-2,474	-1,849	2,27E ⁻⁰⁵	0,045	NP (RI)
ENST00000521671.1	ATP6V1C1-206	-2,336	-1,783	2,23E ⁻⁰⁵	0,045	NP (RI)
ENST00000492118.2	ATF3-209	-5,902	-0,890	2,19E ⁻⁰⁵	0,045	CDS ND
ENST00000380946.3	KLF6-202	-6,306	-0,808	2,09E ⁻⁰⁵	0,045	CDS ND
ENST00000648267.1	C1orf43-211	-2,293	-1,741	2,49E ⁻⁰⁵	0,047	NMD
ENST00000615793.1	UBE2D1-204	-5,506	-1,101	3,30E ⁻⁰⁵	ns	CP (109 aa)
ENST00000482354.5	MOSPD2-204	-3,784	-1,640	3,85E ⁻⁰⁵	ns	CP (486 aa)
ENST00000430330.6	SCP2-206	-3,121	-1,845	5,46E ⁻⁰⁵	ns	CP (140 aa)
ENST00000273598.8	NICN1-201	-2,689	-1,748	5,89E ⁻⁰⁵	ns	CP (213 aa)
ENST00000534329.1	RPS13-210	-0,974	-0,921	6,40E ⁻⁰⁵	ns	NP (RI)
ENST00000622516.5	CUX1-221	-1,847	-1,507	6,83E ⁻⁰⁵	ns	CP (678 aa)
ENST00000647594.1	HDAC8-219	-2,013	-1,588	8,08E ⁻⁰⁵	ns	CP (373 aa)

ENST00000466807.5	DPH5-206	-1,724	-1,442	8,23E ⁻⁰⁵	ns	CDS ND
ENST00000237305.12	SGK1-201	-4,959	-0,980	8,17E ⁻⁰⁵	ns	CP (431 aa)
ENST00000486949.5	NAMPT-210	-5,274	-0,922	7,78E ⁻⁰⁵	ns	NP (RI)
ENST00000417353.6	FOSB-202	-5,839	-0,736	8,49E ⁻⁰⁵	ns	CP (302 aa)
ENST00000563941.5	MSLN-205	6,796	2,934	7,48E ⁻⁰⁵	ns	CP (622 aa)
ENST00000552242.5	ATP5MC2-208	-2,105	-1,628	8,73E ⁻⁰⁵	ns	CP (141 aa)
ENST00000673750.1	CAPN3-229	-3,371	-1,579	1,05E ⁻⁰⁴	ns	CP (191 aa)
ENST00000588404.5	RASGRP4-209	-3,773	-1,449	1,05E ⁻⁰⁴	ns	NP (RI)
ENST00000491027.6	NAMPT-213	-4,938	-1,069	1,02E ⁻⁰⁴	ns	CP (241 aa)
ENST00000527226.2	TPT1-208	-2,076	-1,573	1,19E ⁻⁰⁴	ns	CP (162 aa)
ENST00000503039.1	ZNF346-202	-1,284	-1,158	1,23E ⁻⁰⁴	ns	CP (319 aa)
ENST00000519199.5	NTAQ1-204	-2,590	-1,752	1,30E ⁻⁰⁴	ns	NMD
ENST00000483591.6	ATXN1-206	-4,166	-1,355	1,58E ⁻⁰⁴	ns	CDS ND
ENST00000403638.7	PASK-203	1,757	1,472	1,71E ⁻⁰⁴	ns	CP (1143 aa)
ENST00000447872.5	VSTM1-206	-3,030	-1,623	1,81E ⁻⁰⁴	ns	NMD
ENST00000586113.1	FOSB-205	-3,821	-1,295	1,97E ⁻⁰⁴	ns	NP (RI)
ENST00000616577.4	TPT1-214	-1,053	-0,977	1,97E ⁻⁰⁴	ns	CP (197 aa)
ENST00000478250.1	NR4A1-205	-3,594	-1,426	2,04E ⁻⁰⁴	ns	NP (RI)
ENST00000436139.6	RASGEF1B-203	-5,042	-0,837	2,33E ⁻⁰⁴	ns	CP (210 aa)
ENST00000564037.1	GBP3-209	-5,311	-0,923	2,46E ⁻⁰⁴	ns	NP (RI)
ENST00000413996.7	SGK1-205	-4,463	-1,027	2,62E ⁻⁰⁴	ns	CP (445 aa)
ENST00000540176.6	STAT1-212	-1,746	-1,408	2,71E ⁻⁰⁴	ns	CP (750 aa)
ENST00000374222.5	UBXN11-206	-1,664	-1,370	2,67E ⁻⁰⁴	ns	CP (520 aa)
ENST00000441435.1	RPL31-210	-1,878	-1,471	2,78E ⁻⁰⁴	ns	CP (108 aa)

Biotipos: CP: codifica proteína; NP: no codifica proteína; CDS ND: CDS no definido; RI: retención de intrón; NMD: degradación del ARNm mediada por codones de parada. Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos de la proteína para la que codifica.

Enriquecimiento de rutas de la expresión diferencial entre pacientes con OIND y pacientes con EM

En el análisis transcriptómico comparativo entre pacientes con OIND y pacientes con EM, se identificaron 19 isoformas con expresión diferencial significativa, correspondientes a 18 genes. Estos genes estaban conectados a través de 11 interacciones, un coeficiente promedio de clustering bastante bajo (0,237) y un valor de enriquecimiento de interacciones proteína-proteína muy significativo ($p < 5,8 \times 10^{-7}$) (Figura 51).

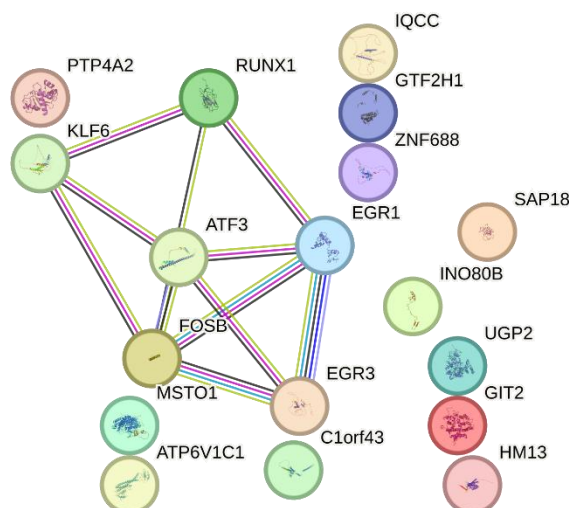


Figura 51. Enriquecimiento de las interacciones proteína-proteína mediante STRING en la comparación pacientes OIND y pacientes con EM

Las proteínas correspondientes a las isoformas identificadas fueron analizadas posteriormente en Cytoscape, y utilizando la aplicación MCODE se obtuvo un único clúster. Sin embargo, este clúster no mostró enriquecimiento significativo. Por este motivo, se procedió a analizar las 18 proteínas individualmente en la plataforma Reactome. Cabe señalar que no se encontraron entradas disponibles para MSTO1, C1orf43, KLF6 ni IQCC. A pesar de ello, el análisis reveló 12 rutas con significación estadística ($FDR < 0,05$), destacando las siguientes: *Señalización por NTRKs*, *Regulación transcripcional por RUNX3*, *Regulación de genes dependientes de MITF-M implicados en la biogénesis lisosomal y la autofagia*, y *Expresión génica regulada por PERK* (Tabla suplementaria 37, Anexo II).

4.4. OBJETIVO IV. Validación de las isoformas con mayor valor discriminativo en el análisis transcriptómico por PCR a tiempo real

4.4.1. Características demográficas y clínicas de los sujetos seleccionados.

En la Tabla 27 se muestran los datos demográficos de los participantes incluidos en la fase de validación del análisis transcriptómico.

Tabla 27. Características demográficas y clínicas de los pacientes con Esclerosis Múltiple (EM) y sujetos control (HC) incluidos en la fase de validación del estudio transcriptómico

	HC n=49	EM n=106	OIND n=7	p-valor
Edad (años)	41 (31-52)	44 (36-51)	48 (36-50)	ns
Mujeres, n (%)	28 (66,7)	76 (71,7)	5 (71,4)	ns
	EMRR n=49	EMSP n = 38	EMPP n = 19	p-valor
Edad (años)	38 (29-44,5)	46 (41-52)	51 (46-57)	3,0E ⁻⁶
Mujeres, n (%)	35 (71,4%)	27 (71,1%)	14 (73,7%)	ns
Tiempo de evolución	1,5 (0,5-8,0)	16 (7,25-20,75)	7 (2,0-10,0)	2,0E ⁻⁶
EDSS	1,25 (1,0-1,63)	5,75 (4,5-6,0)	5 (3,0-6,5)	1,9E ⁻⁷
MSSS	2,44 (0,63-4,27)	5,88 (4,67-6,88)	7,22 (5,94-8,34)	2,5E ⁻⁴
Tasa anualizada de brotes	1,0 (0-2,0)	0 (0-1,75)	-	0,003
Pacientes con actividad por RMN	8/49	2/38	1/19	0,002

Los datos cuantitativos se presentan como medianas con rangos intercuartílicos. p-valor: Se refiere a los valores de p obtenidos de las comparaciones entre los controles sanos y los pacientes con EM mediante la prueba de Mann-Whitney (edad) y la prueba de chi-cuadrado (género). Los p-valores para las comparaciones entre las tres formas clínicas de la EM se calcularon utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de pruebas de comparación por pares (edad, duración de la enfermedad y EDSS). EMRR: EM Remitente Recurrente, EMSP: EM Secundaria Progresiva, EMPP: EM Primaria Progresiva; OIND: otras enfermedades neurológicas inflamatorias. Tiempo de evolución: nº de años desde el inicio de la enfermedad hasta el momento de recolección de la muestra; EDSS: Escala Expandida del Estado de Discapacidad; MSSS: Puntuación en la escala de severidad de la EM. Pacientes con actividad por RMN: nº de pacientes con lesiones nuevas o aumentadas en secuencias T2 o lesiones captadoras de gadolinio en T1; n.s., no significativo.

Las características demográficas de la muestra de validación en el momento de la toma de muestras no mostraron diferencias significativas entre los pacientes con EM, OIND y los controles, en términos de sexo y edad (Tabla 27). Los pacientes con EMRR fueron, en promedio, más jóvenes que los pacientes con EMSP y EMPP ($p_{\text{adj.}} < 0,0001$ para ambas), sin mostrar diferencias estadísticas entre las dos formas progresivas. La relación hombre/mujer no presentó diferencias significativas entre los pacientes con EM en las tres formas clínicas. El tiempo de evolución de la enfermedad fue mayor en el grupo de EMSP en comparación con los pacientes con EMRR ($p_{\text{adj.}} = 7 \times 10^{-7}$). La puntuación en la

escala EDSS, como era de esperar, fue significativamente más baja en EMRR que en ambas formas progresivas ($p < 0,0001$ en ambos casos). La puntuación en la escala MSSS también fue significativamente menor en EMRR en comparación con las formas progresivas ($p_{\text{adj}} = 0,0018$ al compararlo con pacientes EMSP y $p_{\text{adj}} = 0,0001$ al compararlo con pacientes EMPP). Se detectó actividad radiológica de la enfermedad en 8 pacientes del grupo de EMRR, en 2 del EMSP y en 1 del EMPP.

4.4.2. Selección de isoformas

Dada el elevado número de isoformas generadas por procesamiento alternativo que mostraron expresión diferencial en el análisis de RNA-seq, fue necesario establecer un procedimiento de selección para definir un subconjunto destinado a su validación mediante PCR a tiempo real. Como nuestro objetivo principal era la identificación de biomarcadores diagnósticos en la EM, el primer criterio consistió en priorizar las rutas con mayor enriquecimiento diferencial en las comparaciones entre controles y pacientes con las formas clínicas de inicio en el momento del diagnóstico (EMRR vs HC y EMPP vs HC). Posteriormente, la selección de isoformas se restringió a aquellas localizadas dentro de dichas rutas prioritarias.

Como las comparaciones EMRR vs HC y EMPP vs HC no compartieron rutas biológicas enriquecidas, se realizó la selección de rutas y biomarcadores de forma independiente para las dos formas clínicas.

Criterio para la selección de isoformas en los pacientes con EMRR

En la comparación EMRR vs HC, el análisis funcional identificó 23 clústeres con enriquecimiento significativo en Cytoscape. De los dos clústeres con mayor densidad de interacciones (clúster 1 y 2, Figura 37) se seleccionó el **clúster 2** (45 nodos, 420 interacciones y score = 19,09) porque engloba rutas biológicas asociadas con mecanismos fisiopatológicos bien establecidos en la EM, como son las vías inflamatorias mediadas por interleucinas y la señalización del sistema inmune. Dentro de este clúster, las rutas se agruparon en siete grandes grupos funcionales de Gene Ontology (GO), destacando la **Señalización de la interleucina IL-10** (grupo 6) y el **Procesamiento de la interleucina IL-1** (grupo 2) con 36,16% y 33,33% de genes, respectivamente, representando nodos críticos en la regulación de la inflamación, activación inmune y

daño tisular, piroptosis y necrosis, todos ellos procesos característicos de la EM (Figura 52).

Rutas biológicas

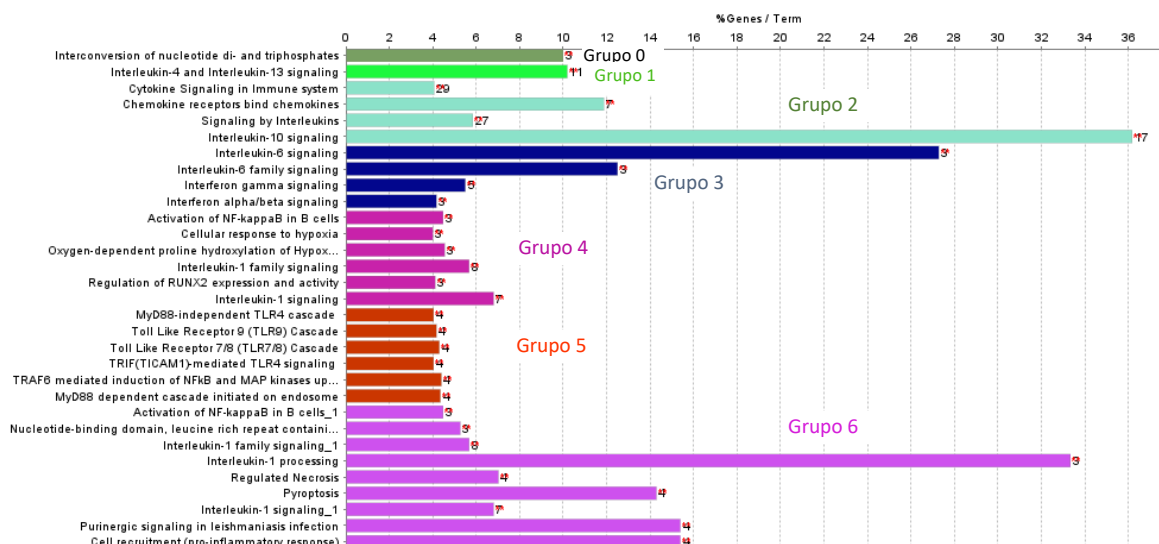


Figura 52. Porcentaje de genes por ruta biológica en cada grupo funcional GO de las isoformas diferencialmente expresadas entre pacientes con EMRR y sujetos control, en clúster 2 tras el análisis con la herramienta ClueGo de Cytoscape.

A partir de estos grupos 2 y 6, se seleccionaron los genes cuya presencia era consistente en gran parte de estas rutas: *IL1A*, *IL1B*, *IL1R1*, *IL1RN*, *NFKB2*, *NFKBIA*, *NFKBIZ*, *NLRP3*, *TNF*, *IL18*, *CASP1*, *ICAM1*, *CCL3*, *CCL3L3*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3* y *CXCL8*. Las isoformas de procesamiento alternativo diferencialmente expresadas de estos genes se consideraron las candidatas óptimas para la validación por PCR a tiempo real, combinando relevancia fisiopatológica, representación funcional y consistencia estadística. En la Tabla 28 se recogen para cada grupo, las p_{adj} del grupo funcional GO y de la ruta, así como los genes asociados identificados en cada una.

Tabla 28. Rutas y genes asociados de los grupos GO 2 y 6 del clúster 2 en la comparación EMRR vs controles, obtenidos con ClueGO

Grupo GO	Ruta	* p_{adj} del GRUPO	* p_{adj} de la RUTA	% Genes asociados	Nº Genes	Genes asociados encontrados
2	Señalización de la interleucina IL-10	3,86E-24	8,69E-30	36,17	17	[CCL2, CCL3, CCL4, CCL3L3, CXCL1, CXCL3, CXCL10, CXCL2, CXCL8, ICAM1, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, PTGS2, TNF, TNFRSF1A]
	Los receptores de quimiocinas se unen a las quimiocinas	3,86E-24	4,09E-08	11,86	7	[CCL3L3, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8]

Resultados

6	Señalización por citoquinas	3,86E-24	2,17E-26	5,84	27	[CASP1, CCL2, CCL3, CCL4, CD86, CSF1, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8, HIF1A, ICAM1, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, JUN, NFKBIA, NOD2, PSMA5, PSMD14, PTGS2, SOCS3, STAT1, TCP1, TNF, TNFRSF1A]
	Señalización por citoquinas en el sistema inmune	3,86E-24	2,67E-24	4,06	29	[CASP1, CCL2, CCL3, CCL4, CD44, CD86, CSF1, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8, HIF1A, ICAM1, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IRF1, JUN, NFKBIA, NOD2, PSMA5, PSMD14, PTGS2, SOCS3, STAT1, TCP1, TNF, TNFRSF1A]
	Procesamiento de la interleucina IL-1	3,12E-08	6,98E-05	33,33	3	[CASP1, IL1A, IL1B]
	Reclutamiento celular	3,12E-08	4,64E-05	15,38	4	[CASP1, IL1A, IL1B, NLRP3]
	Señalización purinérgica en la infección por leishmaniasis	3,12E-08	4,64E-05	15,38	4	[CASP1, IL1A, IL1B, NLRP3]
	Piroptosis	3,12E-08	5,99E-05	14,29	4	[CASP1, IL1A, IL1B, IL1R1]
	Necrosis regulada	3,12E-08	8,30E-04	7,02	4	[CASP1, IL1A, IL1B, IRF1]
	Señalización por interleucina IL-1	3,12E-08	1,91E-06	6,80	7	[IL1A, IL1B, IL1RN, NFKBIA, NFKBIZ, NFKB2, PSMD14]

*Valor de P ajustada tras la corrección por Bonferroni, GO: Gene Ontology

Además, la presencia recurrente de rutas de señalización inmunitaria mediada por interleucinas en otras comparaciones clínicas como EMSP vs HC (clúster 2, Tabla suplementaria 15; clúster 3, Tabla suplementaria 16) y EMRR vs EMSP (clúster 2, Tabla suplementaria 22; clúster 3, Tabla suplementaria 23), refuerza su relevancia biológica. Aunque estas comparaciones no se utilizaron para seleccionar biomarcadores diagnósticos, esta coincidencia sugiere que las rutas identificadas podrían contribuir también a una futura estratificación de pacientes y a la comprensión de los mecanismos de progresión.

Criterio para la selección de isoformas de pacientes con EMPP

A diferencia de lo observado en la comparación EMRR vs. HC, en la que numerosas rutas altamente significativas se agruparon en 23 clústeres principales, el análisis de expresión de isoformas derivadas del procesamiento alternativo en pacientes con EMPP presentó una baja conectividad entre genes y un número reducido de rutas enriquecidas y no permitió identificar ningún clúster significativo. Por otro lado, tras incorporar los genes diferencialmente expresados al análisis de Gene Ontology, ninguno de los procesos biológicos alcanzó significación estadística después de aplicar la corrección por tasa de

descubrimientos falsos (FDR). Las 4 rutas Reactome derivadas del análisis funcional para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo (*Reparación por escisión de bases defectuosa asociada con MUTYH*, *Procesamiento defectuoso del sustrato de MUTYH*, *Enfermedades de la reparación por escisión de bases*, *Desplazamiento de la ADN glicosilasa por APEX1*) sólo incluían un único gen *MUTYH* (Tabla suplementaria 20). Esto exigió un enfoque alternativo para la selección de isoformas candidatas a validación.

Por este motivo, además de considerar las rutas enriquecidas identificadas con Reactome, se incluyeron en la fase de validación aquellas isoformas que mostraron un elevado poder discriminativo entre EMPP y controles, o entre EMPP y las otras dos formas clínicas, durante la fase exploratoria, aun cuando no se integraran en ninguna de las rutas identificadas. La isoforma con mayor relevancia biológica fue *MUTYH*-209. Sin embargo, la base de datos genómica Ensembl registra un total de 47 isoformas alternativas para *MUTYH*, lo que imposibilitó su validación experimental debido a la imposibilidad de diseñar cebadores específicos para esta isoforma concreta. Esta misma limitación, la imposibilidad de diseñar cebadores únicos en genes con numerosas isoformas derivadas del procesamiento alternativo del ARN, también afectó a otras isoformas altamente significativas, como *BUD31*-206, *CETN3*-201, *FAM200B*-201, *FBLN2*-201 y *JHY*-201. Por ello, se priorizaron para la validación experimental aquellas isoformas diferencialmente expresadas en EMPP que cumplieran al menos uno de los siguientes criterios:

1. Participación en alguna de las rutas biológicas identificadas mediante Reactome
2. Expresión diferencial en la comparación entre EMPP y otras formas clínicas de EM, con el fin de identificar mecanismos fisiopatológicos exclusivos de la EMPP.

4.4.3. Optimización de las condiciones experimentales de la PCR a tiempo real

4.4.3.a. Proceso de diseño de cebadores para isoformas de procesamiento alternativo durante la fase de validación

Resultados

En un primer momento, se seleccionaron 94 isoformas correspondientes a 55 genes distintos para su inclusión en la fase de validación. De ellas, se priorizaron 60 isoformas para el análisis experimental, mientras que las 34 restantes se reservaron como respaldo. En la Tabla Suplementaria 38 del Anexo III se presenta la información correspondiente a los 60 pares de cebadores seleccionados para el análisis, incluyendo la secuencia, el tamaño esperado del producto de amplificación, la eficiencia de amplificación, la especificidad y su inclusión o exclusión final en el análisis. Por su parte, la Tabla Suplementaria 39 incluye los 34 pares de cebadores considerados como reserva.

Para comprobar que los cebadores diseñados amplificaban específicamente una única isoforma, se determinó la T_m para cada reacción, como puede observarse en la Figura 53. Así mismo, el producto de amplificación de PCR se analizó mediante electroforesis en gel, con el fin de verificar que el tamaño del amplicón obtenido correspondiera con el esperado.

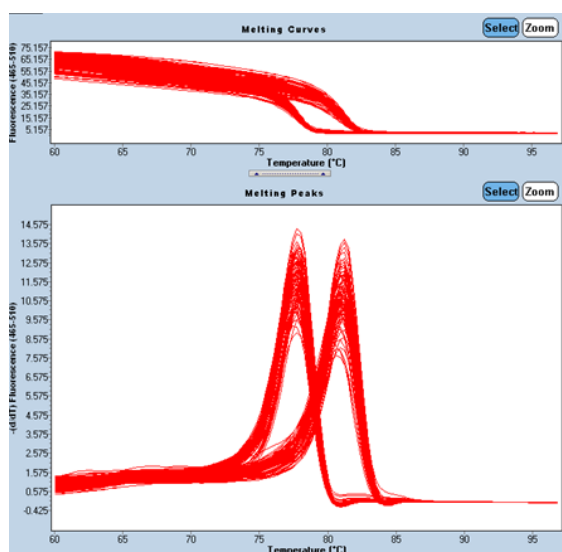


Figura 53. Curvas de melting obtenidas tras la amplificación por qPCR de la isoforma PURA-201 y el gen constitutivo GAPDH.

De las 60 isoformas priorizadas, se logró diseñar cebadores específicos para 49, y entre éstas, 38 presentaron una eficiencia de amplificación cercana a 2, además de generar un único pico en la curva de *melting*. En la Tabla 29 se resumen estas 38 isoformas, así como los cebadores correspondientes a los genes constitutivos utilizados como referencia: *GAPDH* y *UBE2D2*.

Durante la fase de puesta a punto se logró una amplificación adecuada de las isoformas CXCL3-201, IL1 α -201 y NFKBIZ-209; sin embargo, al analizar las muestras de pacientes con EM, no fue posible amplificarlas bajo las condiciones estándar, por lo que estas tres isoformas fueron descartadas y finalmente, se analizaron 35 isoformas en esta fase de validación. Por otra parte, debido a la limitación en el volumen de muestra de los pacientes con OIND, solo fue posible determinar la expresión de 25 isoformas de procesamiento alternativo.

Tabla 29. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de las 38 isoformas de procesamiento alternativo en la validación mediante qPCR, y de los dos genes constitutivos GAPDH y UBE2D2

Isoforma	Secuencia de cebadores	Th	% GC	Tamaño del amplicón
IL1 α -201-F	CAGCCAGAGAGGGAGTCATT	59,40	52	72
IL1 α -201-R	TGTCTGGAACCTTTGGCCATCTT	60,10	45	
IL1 β -201-F	TCCCCAGCCCTTTTGTGAG	60,18	55	113
IL1 β -201-R	GGAGCGAATGACAGAGGGTT	59,75	55	
IL1 β -205-F	GGCCCTAAACAGATGAAGGT	57,3	50	84
IL1 β -205-R	CTCCCTCTTTGAGCTTCCCT	60,3	50	
IL1 β -206-F	GCCTCTGCTACCACTTATTCC	60,49	55	78
IL1 β -206-R	ATAGACCTGTTCACAGCTTTCC	60,31	48	
IL1 β -207-F	GCTCCAGCTCTCTAGCCAA	61,33	60	175
IL1 β -207-R	ATGACGGCTACGTTTATGTGT	60,07	48	
IL1 β -208-F	AAGTAGCTCTGTTGCTCGGC	60,59	55	99
IL1 β -208-R	GGAGTGGGGTGGCTAAGAAC	60,04	60	
IL1R1-205-F	TGCCTCATGCTGACTTGCAG	60,96	55	154
IL1R1-205-R	TTCCCAAGCCCTCTACTCTGA	59,92	52	
IL1RN-205-F	GCCTCCGAGTCACCTAAT	59,48	58	263
IL1RN-205-R	GGACAGGCACATCTTCCCTC	60,11	60	
IL18-206-F	GTAGGGGGAGCGTTGCATAG	60,25	60	174
IL18-206-R	TCTTCTTGCCCCACCCATTC	59,96	55	
NFkB2-203-F	CGGAGAGAAGCCGCAACC	60,82	67	92
NFkB2-203-R	GCCCTCCTCCCTCTTTTCTCTT	61,43	55	
NFkBIA-204-F	GCTCCTCGTGCTTATGTTGTG	59,61	52	71
NFkBIA-204-R	GAAACCAAAGGAATTTGAGATGCT	58,77	36	
NFkBIA-205-F	ATGTAGCAGAGTCACCCAGA	60,27	52	88
NFkBIA-205-R	GATGTGGGCTGATGTGAAGTA	57,73	48	
NFkBIA-206-F	GGGTTGAGGGGAACCTCGG	59,33	67	70
NFkBIA-206-R	CTACGAATGCAAGAGAGACCAGA	59,87	48	
NFkBIA-207-F	CAACTACAATGGAGCCCTGT	57,5	50	103
NFkBIA-207-R	ACATCAGCCCCACACTTCAA	59,52	50	
NFkBIA-208-F	TGTCAATGCTCAGCTCACCT	59,31	50	155

Resultados

NFkBIA-208-R	GCTCGTCCTCTGTGAACTCC	60,11	60	
NFkBIA-209-F	CGAAGTCCCCGGTTGCATAA	60,39	55	90
NFkBIA-209-R	CTCGGAACGCCCTGTACTTC	60,46	60	
NFkBIZ-206-F	CTGTGCAGTCATAGCCCACAA	60,61	52	167
NFkBIZ-206-R	TGCCATTGTAAGCCTTCGCT	60,32	50	
NFkBIZ-209-F	AGCAGAGGATAAGGGTTTGGG	59,43	52	109
NFkBIZ-209-R	CAGCAGTTTCCTTTCTTTGACG	58,96	43	
NFkBIZ-205-F	AAGTTAGAGGCCATCCTCAGC	59,51	52	72
NFkBIZ-205-F	GCAGTGGTCAAGCATCCCA	60,3	58	
NFkBIZ-210-F	GCTTGGGATTAAGCAAGGCA	58,81	50	86
NFkBIZ-210-F	TCACCCAGTCTCCTGAATGTC	59,1	52	
CASP1-205-F	CAAGAAGCTGAGACGGGATTGT	60,61	50	153
CASP1-205-R	GCTGAGCTTCTGACTTCGTT	58,21	50	
TNF-208-F	AGAACTACTGGGCCTACA	60,18	55	177
TNF-208-R	GCTCCGTGTCTCAAGGAAGT	59,68	55	
NLRP3-206-F	TTCCTCTCTAGCTGTTCTGAG	58,64	50	106
NLRP3-206-R	TCGGTCCACAGAAAGTTC	57,77	50	
PLAUR-214-F	AACGAGGGCCAAAACCGAA	62,63	50	75
PLAUR-214-R	GGCATGTTGGCACATTGAGG	60,11	55	
ICAM1-201-F	TTTGTTAGCCACCTCCCCAC	59,4	55	94
ICAM1-201-R	GCATATTCCCTGGGCACTCA	59,4	55	
ICAM1-203-F	GACCAGACCTAGCAATAGAC	57,95	43	199
ICAM1-203-R	GGGAGCCCTACCTCTTCAGTA	60,06	60	
RPL15-210-F	TGCCCTAGTCAGGAATGGAGT	60,27	52	225
RPL15-210-R	GCCCAAGGTCAATCTCCAC	60,68	60	
ELAC1-201-F	CATGAGACGTTGGACAGGCA	60,32	55	80
ELAC1-201-R	ACCTAGCCAAACCCTGCATT	56,59	50	
PURA-201-F	AGGAGCGGAAGGTATCAGT	60,03	55	138
PURA-201-R	CACACTCAACCAGGGAGCAT	58,96	55	
CCL3-204-F	CATTCCGTCACCTGCTCAGAA	60,30	52	190
CCL3-204-R	CTGGCTGCTCGTCTCAAAGTA	60,10	52	
CCL3L3-203-F	CCTAGTCTCAGTTGCTGCTG	60,41	57	103
CCL3L3-203-R	CTGGCTGCTCGTCTCAAAGT	60,32	55	
CXCL8-202-F	GACCATACATAGTTTGCCAGGA	60,12	48	89
CXCL8-202-R	AGGACACTACTGGGAGTGACAA	60,43	50	
CXCL2-202-F	AGGTCAAACCAAGTTAGTTCA	57,5	41	74
CXCL2-202-R	TGACTAGAGAATATCTGCAAACCT	57,20	38	
CXCL2-203-F	TTGTCTCAACCCGCATCG	60,38	58	123
CXCL2-203-F	CAGACGCCAGTATTCTGACCA	60,35	50	
CXCL3-204-F	AAGGGTTCGCCGATCTTGG	60,08	58	231
CXCL3-204-R	CAGCGCAGTTCAAGTGACCA	60,60	58	
CXCL3-201-F	AAATGACAGGGTGGGGAAGT	60,00	52	86
CXCL3-201-R	TTCCCTTACCCTAACAGTGATCC	59,20	48	
CXCL1-201-F	CTGGCTTAGAACAAAGGGGCT	60,30	52	136

CXCL1-201-R	TAAAGGTAGCCCTTGTTTCCCC	60,00	50	133
RNASEL-201-F	AGGTTGCTTGAGGGATGA	58,9	50	
RNASEL-201-R	CATTAGGGGTCAAGGCACTCA	59,70	52	
GAPDH-F	GAAGATGGTGATGGGATTTC	55,3	45	
GAPDH-R	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	56	55	
UBE2D2-F	TGAATGATCTGGCACGGGAC	59,4	55	
UBE2D2-R	GGACTGTCATTGGCCCAT	59,4	55	

Se indican los cebadores sentido (F) y anti-sentido (R), su temperatura de hibridación (Th) en °C, el porcentaje de guanina y citosina (GC) de la secuencia y el tamaño del producto amplificado en nucleótidos.

En la Figura suplementaria del Anexo III se muestra una representación gráfica de la ubicación de los 38 pares de cebadores seleccionados a lo largo de las secuencias génicas correspondientes a 23 genes. Esta visualización permite identificar las regiones específicas de los transcritos diana sobre las que fueron diseñados los cebadores incluidos en el análisis final. Además, se incluyen otras isoformas del mismo conjunto de 23 genes que, si bien fueron consideradas inicialmente, no cumplieron con los criterios técnicos requeridos y no fueron incluidas en el análisis definitivo, aunque se representan igualmente.

Como se ha mencionado en la sección de material y métodos, para evaluar la reproducibilidad de la técnica entre distintas placas, se calculó el CV a partir de los valores de Ct obtenidos para los genes de referencia en el calibrador. Los resultados mostraron una variabilidad baja entre placas, con un CV del 3,11 % para *GAPDH* y del 3,06 % para *UBE2D2*. También se calculó el CV a partir de los valores Ct de los genes diana, o isoformas, con unos resultados que variaron entre 0,52% y 7,31%, lo que confirma la consistencia de la técnica y la fiabilidad de los datos obtenidos para el análisis de expresión de las isoformas.

El análisis de la estabilidad de los dos genes de referencia en pacientes con EM y en controles sanos no reveló diferencias significativas para ninguno de los dos, lo que sugiere que ninguno de ellos presenta variaciones atribuibles a factores biológicos. En conjunto, tanto la baja variabilidad técnica observada en el calibrador como la ausencia de diferencias biológicas respaldan la idoneidad de *GAPDH* y *UBE2D2* como genes de referencia para la normalización de la expresión génica en este estudio.

4.4.3.b. Comparación de resultados entre el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y el método E de Pfaffl

Con el fin de validar la solidez y sensibilidad del análisis de expresión génica relativa realizado en este estudio, durante la puesta a punto de la técnica se compararon los resultados estadísticos obtenidos mediante los dos enfoques metodológicos mencionados.

La comparación mostró un alto grado de concordancia general entre ambos métodos abarcando un total de 210 comparaciones (35 isoformas por 6 comparaciones por pares entre diferentes formas clínicas de EM y HC). Sin embargo, de estas 210 comparaciones se identificaron 7 comparaciones (3,3% del total) que representaron diferencias en el nivel de significación estadística: 5 casos en los que el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, presentó una mayor significación estadística, y 2 casos en el que mostró una menor significación en comparación con el método E. La Tabla 30 resume los cambios en el nivel de significancia estadística observados entre ambos métodos.

Tabla 30. Cambios en el nivel de significación estadística de la expresión diferencial obtenida por qPCR, comparando los métodos $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y E de Pfaffl.

Isoforma	Eficiencia	Comparativa	P_{adj}	
			$\Delta\Delta Ct$	E
IL1B-208	2,87	HC vs PP	0,027	ns
IL1RN-205	2	HC vs SP	0,003	0,041
CXCL1-201	1,91	RR vs PP	0,025	0,008
CXCL2-202	2,1	PP vs SP	0,002	0,017
ELAC1-201	1,95	RR vs SP	0,004	0,0007
PURA-201	2,1	PP vs SP	0,026	ns
PLAUR-214	2,39	RR vs PP	0,006	0,0371

Se indican los valores de p ajustada obtenidos por ambos métodos en aquellas comparaciones donde se observaron diferencias. ns: no significativo.

En general, se observó que el método E tiende a comportarse de forma más conservadora, reduciendo la significación estadística en la mayoría de los casos. Este comportamiento puede explicarse porque el método E incorpora la eficiencia real de amplificación (E) de cada gen en el cálculo de la expresión relativa, evitando así posibles

sobreestimaciones que podrían derivarse de asumir una eficiencia ideal ($E = 2$), como ocurre en el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

No obstante, la presencia de diferencias fue limitada y no alteró los patrones generales de expresión observados. Debido a la amplia utilización del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en la literatura, y con el objetivo de facilitar la comparación de nuestros resultados con los publicados en otros estudios, se decidió mantener este modelo matemático como base para los análisis principales.

Este análisis comparativo refuerza la fiabilidad y robustez de los resultados obtenidos en este trabajo y subraya la relevancia de explorar diferentes estrategias de normalización y cuantificación en el contexto experimental.

4.4.4. Validación por PCR a tiempo real

Con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, los análisis se organizaron agrupando las isoformas según las vías de señalización a las que pertenecen y, dentro de cada grupo, en función de su capacidad para codificar proteínas.

Las comparaciones correspondientes a isoformas para las que no se disponía de muestras de pacientes con EMPP se han dejado sin completar.

4.4.4.a. Isoformas pertenecientes a la vía de procesamiento de la IL1: el inflammasoma NLRP3

Dentro de las 35 isoformas incluidas en la fase de validación, agrupamos 21 de ellas que inicialmente se habían clasificado dentro de la vía de procesamiento de IL-1. Sin embargo, este conjunto corresponde de forma más precisa a la señalización del inflammasoma, ya que la maduración de IL-1 β depende de su activación, concretamente del inflammasoma NLRP3, cuya vía de señalización incluye genes como *NFkB*, *NLRP3*, *CASP1*. Por ello, y para emplear un término funcionalmente más preciso, a partir de este punto nos referiremos a este grupo como genes del inflammasoma.

En este grupo identificamos 9 isoformas codificantes y 12 no codificantes (incluyendo isoformas con retención de intrón y CDS no definido), todas ellas vinculadas a componentes o reguladores clave de esta ruta inflamatoria.

4.4.4.a.I. Isoformas codificantes de proteína

Las principales isoformas con expresión diferencial codificantes de proteínas en esta vía se agruparon en torno al gen de la interleucina 1, su receptor y el antagonista de su receptor; a la subunidad 2 del factor de transcripción NFκB, a los inhibidores alpha o zeta de este factor; a la proteína 3 con dominio pirina de la familia NLR (*NLRP3*), componente clave del inflamasoma, y al factor de necrosis tumoral, que, si bien no forma parte directa del inflamasoma, mantiene una relación funcional estrecha con esta vía, ya que su señalización a través de TNFR activa NFκB y contribuye a la transcripción de citoquinas proinflamatorias como IL1β. En la Tabla 31 se muestran las comparaciones significativas.

Tabla 31. Expresión diferencial de las isoformas de procesamiento alternativo pertenecientes a la vía de señalización del inflamasoma y codificantes de proteína entre las formas clínicas EMRR, EMSP, EMPP y los sujetos sanos (HC).

Isoforma	Kruskal-Wallis p-valor	Comparaciones múltiples					
		EMRR vs HC	EMSP vs HC	EMPP vs HC	EMRR vs EMSP	EMRR vs EMPP	EMSP vs EMPP
IL1β -201	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL1R1-205	1,4E⁻⁸	2,0E ⁻⁵	ns	ns	4,2E ⁻⁸	ns	ns
IL1RN-205	0,002	0,013	0,003	ns	ns	ns	ns
NFκB2-203	0,0041	ns	ns	ns	0,006	ns	ns
NFκBIA-208	ns	ns	ns	-	ns	-	-
NKκBIA-209	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NFκBIZ-206	2,0E⁻⁶	0,005	ns	ns	3,0E ⁻⁶	ns	ns
NLRP3-206	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TNF-208	0,004	ns	ns	0,018	ns	0,006	0,006

Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pruebas post hoc de comparaciones por pares. Se recoge el valor de p ajustada tras la corrección de Bonferroni. ns, no significativo

La representación gráfica de la expresión diferencial por qPCR de las isoformas codificantes se muestra en la Figura 54.

Los pacientes con EMRR mostraron una mayor expresión génica de las isoformas IL1R1-205, IL1RN-205 y NFκBIZ-206 en comparación con los controles sanos ($p_{\text{adj}} = 2E^{-5}$, $p_{\text{adj}} = 0,013$ y $p_{\text{adj}} = 0,005$, respectivamente), en concordancia con los resultados observados en la fase exploratoria. En el grupo de pacientes con EMSP, también se observó una sobreexpresión de la isoforma IL1RN-205 ($p_{\text{adj}} = 0,003$). En cuanto a los pacientes con

EMPP, mostraron una mayor expresión de TNF-208 (actualmente renombrada como TNF-201) que los HC ($p_{\text{adj}} = 0,018$).

Además, los pacientes con EMRR mostraron una mayor expresión de las siguientes isoformas en comparación con los pacientes con EMSP: IL1R1-205 ($p_{\text{adj}} = 4,2E^{-8}$), NFkBIZ-206 ($p_{\text{adj}} = 3,0E^{-6}$) y NFkB2-203 ($p_{\text{adj}} = 0,006$). Por su parte los pacientes con EMPP mostraron una expresión significativamente más elevada de la isoforma TNF-208 que aquellos con inicio en brotes ($p_{\text{adj}} = 0,006$ para ambas comparaciones).

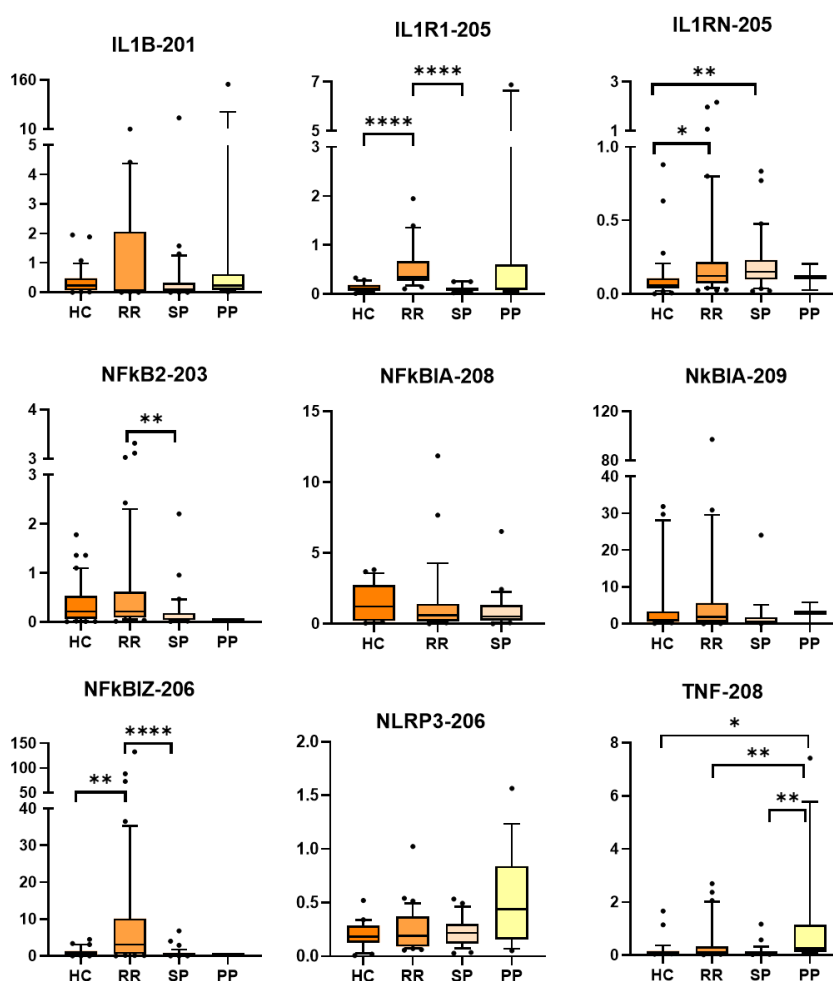


Figura 54. Expresión diferencial de las isoformas codificantes de proteína asociadas a la vía de señalización del inflammasoma NLRP3 comparando las distintas formas clínicas de EM y grupos control. Los niveles de expresión fueron determinados mediante qPCR en la muestra de validación. En cada diagrama de cajas, la línea horizontal dentro de la caja representa la mediana. Los límites superior e inferior de la caja indican los percentiles 25 y 75, y los bigotes (*whiskers*) se extienden hasta los percentiles 10 y 90. HC: controles sanos; RR: EM remitente recurrente; EMSP: EM secundaria progresiva; PP: EM primaria progresiva. * $p_{\text{adj}} < 0,05$; ** $p_{\text{adj}} < 0,01$; *** $p_{\text{adj}} < 0,001$; **** $p_{\text{adj}} < 0,0001$.

4.4.4.a.II. Isoformas no codificantes de proteína

Las principales isoformas con expresión diferencial no codificantes de proteínas en esta vía se agruparon en torno a gen de *IL1β*, *NFκBIA*, *NFκBIZ* y *Caspasa 1* (Tabla 32).

Tabla 32. Expresión diferencial de las isoformas de procesamiento alternativo pertenecientes a la vía de señalización del inflammasoma y no codificantes de proteína. entre las formas clínicas EMRR, EMSP, EMPP y los sujetos sanos (HC).

Isoforma	Kruskal-Wallis p-valor	Comparaciones múltiples					
		EMRR vs HC	EMSP vs HC	EMPP vs HC	EMRR vs EMSP	EMRR vs EMPP	EMSP vs EMPP
IL1β -205	0,016	0,009	ns	ns	ns	ns	ns
IL1β -206	9,20E-7	ns	ns	0,004	ns	5,6E-5	5,0E-7
IL1β -207	2,8E-5	ns	0,007	ns	ns	0,005	3,0E-5
IL1β -208	7,40E-8	ns	0,002	0,027	ns	1,3E-4	4,8E-8
IL18-206	0,003	ns	ns	0,003	ns	ns	0,007
NFκBIA-204	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NFκBIA-205	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NFκBIA-206	0,002	0,019	0,003	ns	ns	ns	ns
NFκBIA-207	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NFκBIZ-205	0,035	ns	ns	ns	ns	0,041	ns
NFκBIZ-210	0,039	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CASP1-205	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pruebas post hoc de comparaciones por pares. Se recoge el valor de p ajustada tras la corrección de Bonferroni. ns, no significativo.

NFκBIA-206 presentó una sobreexpresión significativa en EMRR y EMSP frente a HC ($p_{\text{adj}} = 0,019$ y $p_{\text{adj}} = 0,003$, respectivamente). Por el contrario, al compararlas con los HC, los pacientes EMRR mostraron una menor expresión de IL1β-205 ($p_{\text{adj}} = 0,009$) y los pacientes con EMSP mostraron una reducción en la expresión de IL1β-207 ($p_{\text{adj}} = 0,007$) y de IL1β-208 ($p_{\text{adj}} = 0,002$). Por su parte, los pacientes con EMPP mostraron niveles de expresión significativamente más altos de IL1β -206, IL1β-208 e IL18-206 en comparación con HC ($p_{\text{adj}} = 0,004$, y $p_{\text{adj}} = 0,027$, $p_{\text{adj}} = 0,003$, respectivamente).

La isoforma IL1β-206 presentó una expresión significativamente mayor en los pacientes con EMPP en comparación con aquellos con EMRR ($p_{\text{adj}} = 5,6E-5$) y EMSP ($p_{\text{adj}} = 5,0E-7$). De forma similar, las isoformas IL1β-207 e IL1β-208 también se encontraron sobreexpresadas en EMPP frente a EMRR ($p_{\text{adj}} = 0,005$ y $p_{\text{adj}} = 1,3E-4$, respectivamente) y

EMSP ($p_{\text{adj}} = 3,0\text{E}^{-5}$ y $p_{\text{adj}} = 4,8\text{E}^{-8}$, respectivamente). Asimismo, los pacientes con formas EMPP también presentaron una mayor expresión de la isoforma IL18-206 en comparación con los pacientes con EMSP ($p_{\text{adj}} = 0,007$), y de la variante NFKBIZ-205 con respecto a los pacientes con EMRR ($p_{\text{adj}} = 0,041$), tal y como se muestra en la Figura 55.

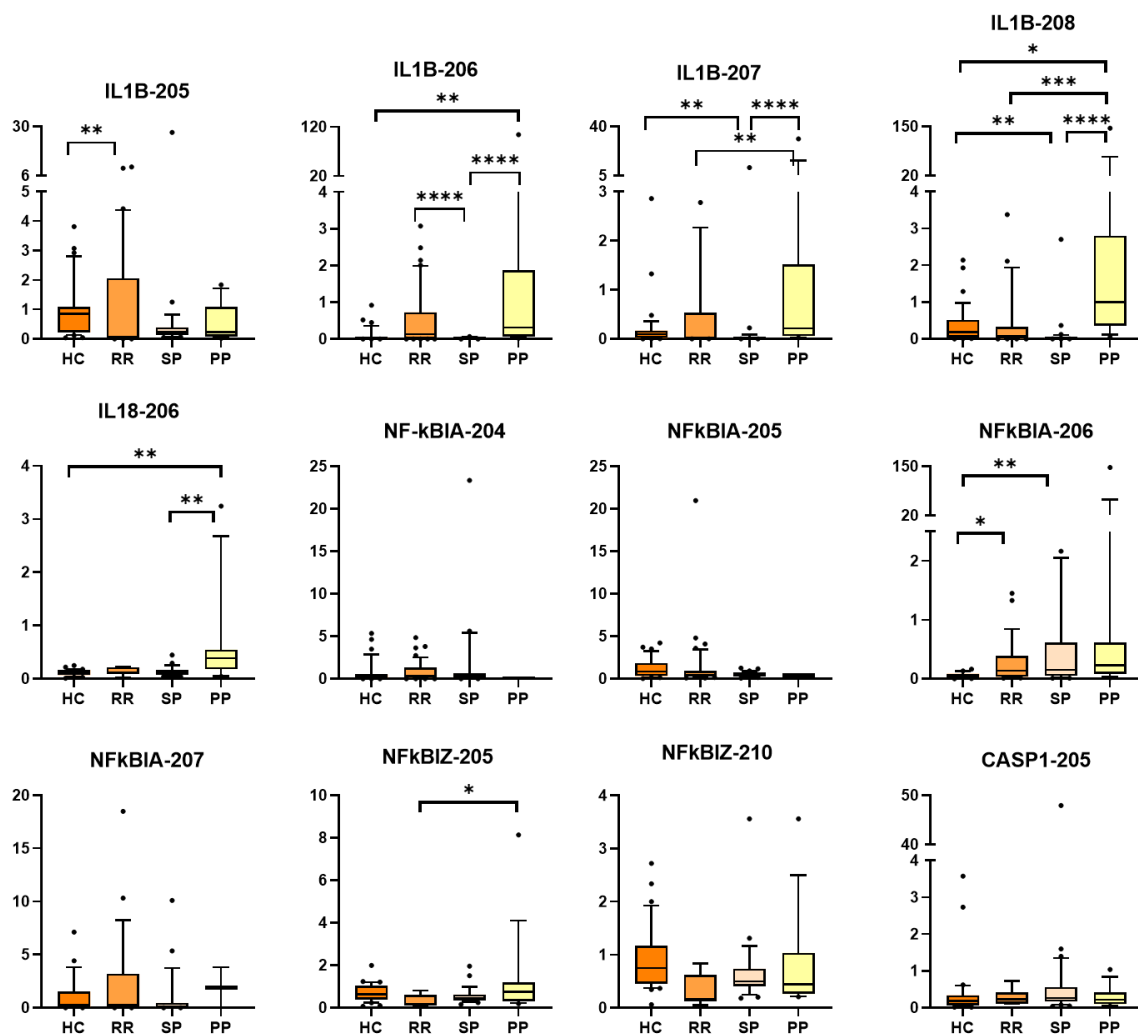


Figura 55. Expresión diferencial de las isoformas no codificantes de proteína asociadas a la vía de señalización del inflammasoma NLRP3, comparando las distintas formas clínicas de EM y grupos control. Los niveles de expresión fueron determinados mediante qPCR en la muestra de validación. En cada diagrama de cajas, la línea horizontal dentro de la caja representa la mediana. Los límites superior e inferior de la caja indican los percentiles 25 y 75, y los bigotes (*whiskers*) se extienden hasta los percentiles 10 y 90. HC: controles sanos; RR: EM remitente recurrente; EMSP: EM secundaria progresiva; PP: EM primaria progresiva * $p_{\text{adj}} < 0,05$; ** $p_{\text{adj}} < 0,01$; *** $p_{\text{adj}} < 0,001$; **** $p_{\text{adj}} < 0,0001$

4.4.4.b. Isoformas pertenecientes a la vía de señalización de la IL10: quimiocinas y moléculas de adhesión.

En este grupo se incluyeron nueve isoformas, de las cuales seis eran codificantes de proteína.

4.4.4.b.I. Isoformas codificantes de proteína

En Tabla 33 se muestra la expresión diferencial de las isoformas codificantes de proteína de citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, en la comparación entre las distintas formas clínicas entre sí y con los controles sanos.

Tabla 33. Expresión diferencial de las isoformas de procesamiento alternativo pertenecientes a las citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, codificantes de proteína, entre las formas clínicas EMRR, EMSP, EMPP y los sujetos sanos (HC).

Isoforma	Kruskal-Wallis p-valor	p _{adj} en pruebas de comparación por pares					
		EMRR vs HC	EMSP vs HC	EMPP vs HC	EMRR vs EMSP	EMRR vs EMPP	EMSP vs EMPP
ICAM1-201	2,3E⁻⁷	0,009	ns	ns	5,1E ⁻⁸	0,024	ns
CCL3-204	0,012	0,006	ns	ns	ns	ns	ns
CCL3L3-203	6,0E⁻⁵	ns	0,033	5,7E ⁻⁴	0,052	9,7E ⁻⁴	ns
CXCL1-201	0,010	ns	ns	ns	ns	0,025	0,006
CXCL2-202	1,8E⁻⁴	ns	0,006	ns	0,002	ns	0,002
CXCL8-202	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pruebas post hoc de comparaciones por pares. Se recoge el valor de p ajustada tras la corrección de Bonferroni. ns, no significativo.

Los pacientes con EMRR presentaron una mayor expresión de ICAM1-201 ($p_{adj} = 0,009$) y menor de CCL3-204 ($p_{adj} = 0,006$) que los HC. Por su parte, la isoforma CCL3L3-203 se encontró significativamente infraexpresada en los pacientes EMSP ($p_{adj} = 0,033$) y EMPP ($p_{adj} = 5,7E^{-4}$) respecto a los HC. De manera similar, la isoforma CXCL2-202 mostró una menor expresión en EMSP que en HC ($p_{adj} = 0,006$).

Al comparar las diferentes formas clínicas de EM, ICAM1-201 se halló significativamente sobreexpresada en los pacientes EMRR en comparación con aquellos con EMSP ($p_{adj} = 5,1E^{-8}$) y EMPP ($p_{adj} = 0,024$). Asimismo, la isoforma CCL3L3-203 presentó una mayor expresión en pacientes con EMRR que en aquellos con EMPP ($p_{adj} = 9,7E^{-4}$). Por último, la isoforma CXCL2-202 se encontró infraexpresada en los pacientes con EMSP frente a aquellos con EMRR y EMPP ($p_{adj} = 0,002$ en ambos casos).

Por su parte, los pacientes con EMPP mostraron una expresión significativamente más elevada de CXCL1-201 frente a EMRR ($p_{\text{adj}} = 0,025$) y frente a EMSP ($p_{\text{adj}} = 0,006$), tal como se muestra en la Figura 56.

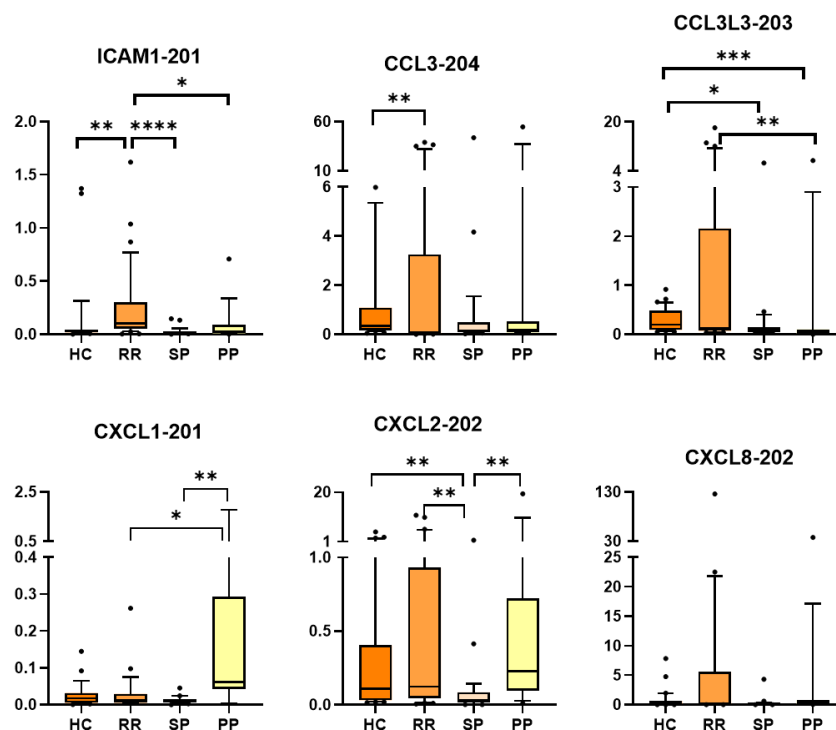


Figura 56. Expresión diferencial de las citoquinas, quimiocinas, y moléculas de adhesión codificantes de proteína, comparando las distintas formas clínicas de EM y grupos control. Los niveles de expresión fueron determinados mediante qPCR en la muestra de validación. En cada diagrama de cajas, la línea horizontal dentro de la caja representa la mediana. Los límites superior e inferior de la caja indican los percentiles 25 y 75, y los bigotes (*whiskers*) se extienden hasta los percentiles 10 y 90. HC: controles sanos; RR: EM remitente recurrente; EMSP: EM secundaria progresiva; PP: EM primaria progresiva * $p_{\text{adj}} < 0,05$; ** $p_{\text{adj}} < 0,01$; *** $p_{\text{adj}} < 0,001$; **** $p_{\text{adj}} < 0,0001$.

4.4.4.b.II. Isoformas no codificantes de proteína

En el análisis de isoformas no codificantes de proteína dentro de esta ruta correspondientes a la vía de señalización y procesamiento de la IL10 y moléculas de adhesión, se incluyeron tres isoformas: ICAM1-203, CXCL2-203 y CXCL3-204 (Tabla 34).

Tabla 34. Expresión diferencial de las isoformas de procesamiento alternativo pertenecientes a las citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, no codificantes de proteína, entre las formas clínicas EMRR, EMSP, EMPP y los sujetos sanos (HC).

Isoforma	Kruskal-Wallis p-valor	Comparaciones múltiples					
		EMRR vs HC	EMSP vs HC	EMPP vs HC	EMRR vs EMSP	EMRR vs EMPP	EMSP vs EMPP
ICAM1-203	0,0060	ns	ns	ns	0,016	ns	0,016
CXCL2-203	0,0001	0.0001	0,019	ns	ns	0,036	ns
CXCL3-204	1,2E-5	ns	ns	0,0002	ns	1,0E-5	4,5E-4

Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pruebas post hoc de comparaciones por pares. Se recoge el valor de p ajustada tras la corrección de Bonferroni. Se recoge el valor de p ajustada tras la corrección de Bonferroni. ns, no significativo.

La isoforma CXCL2-203 mostró una menor expresión en pacientes con las formas de inicio en brotes que los HC ($p_{\text{adj}} = 0,0001$ y $p_{\text{adj}} = 0,0019$, respectivamente). La isoforma CXCL3-204 mostró una expresión más elevada en los pacientes con EMPP que los HC ($p_{\text{adj}} = 0,0002$) y que aquellos con inicio en brotes ($p_{\text{adj}} = 1,0E^{-5}$, $p_{\text{adj}} = 4,5E^{-4}$, respectivamente).

La isoforma ICAM1-203 mostró una menor expresión en pacientes con EMSP que en aquellos con EMRR y EMPP ($p_{\text{adj}} = 0,016$ en ambos casos). Y finalmente, los pacientes con EMPP mostraron mayor expresión de CXCL2-203 que aquellos con EMRR ($p_{\text{adj}} = 0,036$), (Figura 57).

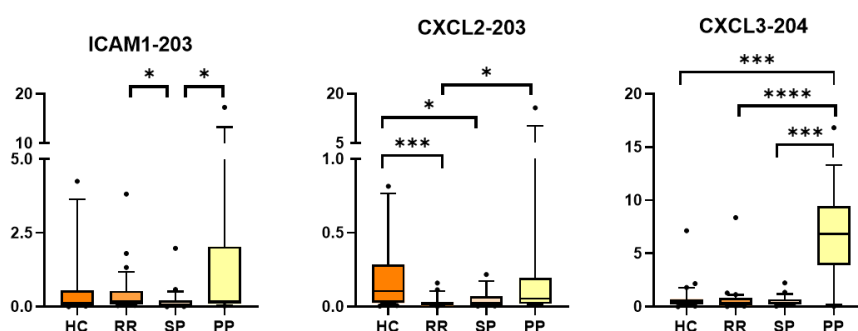


Figura 57. Expresión diferencial de las citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión no codificantes de proteína, comparando las distintas formas clínicas de EM y grupos control. En cada diagrama de cajas, la línea horizontal dentro de la caja representa la mediana. Los límites superior e inferior de la caja indican los percentiles 25 y 75, y los bigotes (*whiskers*) se extienden hasta los percentiles 10 y 90. HC: controles sanos; RR: EM remitente recurrente; EMSP: EM secundaria progresiva; PP: EM primaria progresiva * $p_{\text{adj}} < 0,05$; ** $p_{\text{adj}} < 0,01$; *** $p_{\text{adj}} < 0,001$; **** $p_{\text{adj}} < 0,0001$

4.4.4.c. Otras isoformas diferencialmente expresadas en los pacientes con EMPP durante la fase exploratoria previa

En el análisis transcriptómico de la fase exploratoria se identificaron cinco isoformas diferencialmente expresadas entre los diferentes grupos, que no se agrupaban en ninguna vía de señalización común. Los resultados estadísticos correspondientes se recogen en la Tabla 35. De estas cinco isoformas, RPL15-210 corresponde a una isoforma no codificante (retención de intrón), mientras que el resto, ELAC1-201, PURA-201, PLAUR-214 y RNASEL-201, son isoformas codificantes de proteína.

Tabla 35. Expresión diferencial del resto de las isoformas entre las formas clínicas EMRR, EMSP, EMPP y los sujetos sanos (HC).

Isoforma	Biotipo	Kruskal-Wallis p-valor	Comparaciones múltiples					
			EMRR vs HC	EMSP vs HC	EMPP vs HC	EMRR vs EMSP	EMRR vs EMPP	EMSP vs EMPP
RPL15-210	RI	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ELAC1-201	CP	0,002	ns	ns	ns	0,004	ns	0,007
PURA-201	CP	3,9E⁻⁸	5,0E ⁻⁶	ns	ns	8,7E ⁻⁷	ns	0,026
PLAUR-214	CP	1,2E⁻⁵	ns	ns	4,0E ⁻⁶	ns	0,006	0,001
RNASEL-201	CP	2,8E⁻¹²	0,003	ns	4,3E ⁻⁷	3,0E ⁻⁶	ns	2,0E ⁻¹⁰

Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pruebas post hoc de comparaciones por pares. Se recoge el valor de p ajustada tras la corrección de Bonferroni. Se recoge el valor de p ajustada tras la corrección de Bonferroni. ns, no significativo. RI: Retención de intrón; CP: Codificadora de proteína.

Los hallazgos encontrados en la fase exploratoria para la isoforma RPL15-210 no se replicaron por PCR a tiempo real.

Para el resto de las isoformas, en el análisis de Kruskal-Wallis entre cada forma clínica y los controles sanos, se observaron los siguientes hallazgos:

- La isoforma PURA-201 estaba infraexpresada en los pacientes con EMRR con respecto a los controles ($p_{\text{adj}} = 5,0\text{E}^{-6}$)
- La isoforma PLAUR-214 se mostró sobreexpresada en pacientes con EMPP en comparación con HC ($p_{\text{adj}} = 4,0\text{E}^{-6}$)
- La isoforma RNASEL-201 presentó una mayor expresión en pacientes con EMRR y EMPP frente a HC ($p_{\text{adj}} = 0,003$ y $p_{\text{adj}} = 4,3\text{E}^{-7}$, respectivamente)

En la comparación entre las diferentes formas clínicas se observó:

Resultados

- Las isoformas ELAC-201 y RNASEL-201 presentaban niveles más altos en EMRR ($p_{\text{adj}} = 0,004$ y $p_{\text{adj}} = 3,0E^{-6}$, respectivamente) y EMPP ($p_{\text{adj}} = 0,007$ y $p_{\text{adj}} = 2,0E^{-10}$, respectivamente) que en los pacientes con EMSP.
- Por el contrario, la isoforma PURA-201 mostraba niveles más altos en pacientes con EMSP que en aquellos con EMRR ($p_{\text{adj}} = 8,7E^{-7}$) y EMPP ($p_{\text{adj}} = 0,026$).
- Por último, la isoforma PLAUR-214 presentaba niveles más altos en los pacientes con EMPP que en aquellos con formas de inicio en brotes ($p_{\text{adj}} = 0,006$ frente a EMRR y $p_{\text{adj}} = 0,001$ frente a EMSP).

Todas estas comparaciones se muestran en la Figura 58.

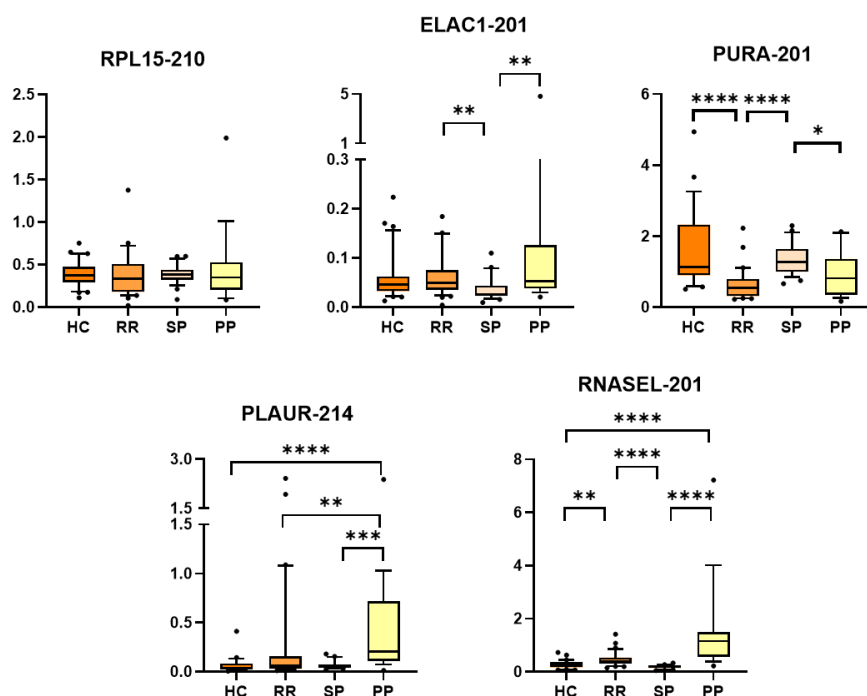


Figura 58. Expresión diferencial de del resto de las isoformas de procesamiento alternativo, comparando las distintas formas clínicas de EM y grupos control. Los niveles de expresión fueron determinados mediante qPCR en la muestra de validación. En cada diagrama de cajas, la línea horizontal dentro de la caja representa la mediana. Los límites superior e inferior de la caja indican los percentiles 25 y 75, y los bigotes (*whiskers*) se extienden hasta los percentiles 10 y 90. HC: controles sanos; RR: EM remitente recurrente; EMSP: EM secundaria progresiva; PP: EM primaria progresiva * $p_{\text{adj}} < 0,05$; ** $p_{\text{adj}} < 0,01$; *** $p_{\text{adj}} < 0,001$; **** $p_{\text{adj}} < 0,0001$

4.4.5. Evaluación de la capacidad diagnóstica mediante curvas ROC

Con el objetivo de explorar el potencial diagnóstico de las isoformas analizadas, se realizó un análisis ROC utilizando la presencia de EM como variable de referencia. Para ello, se agruparon los pacientes con las dos formas clínicas de inicio: EMRR y EMPP. De este

modo, se identificaron seis isoformas que presentaron resultados significativos. El índice Youden inferior a 6 muestra una capacidad discriminativa y un potencial como biomarcador diagnóstico moderada (Tabla 36).

Tabla 36. Área bajo la curva (AUC) asociada del análisis ROC cuando el estado predictivo se definió como padecer EM para las isoformas con resultados estadísticamente significativos. Se incluyen los límites superior e inferior del intervalo de confianza (IC) al 95 %, así como los valores de p, el punto de corte (cut-off) y el índice de Youden máximo.

Isoforma	AUC (95 % IC)	p-valor	Cut-off óptimo	Youden máximo
IL1R1-205	0,832 (0,735 - 0,930)	4,7E ⁻⁰⁶	0,236	0,591
IL1RN-205	0,694 (0,578 - 0,810)	0,003	0,068	0,338
NFKBIZ-206	0,727 (0,612 - 0,841)	0,001	3,530	0,420
NFKBIA-206	0,741 (0,611 - 0,871)	0,002	0,134	0,495
ICAM1-201	0,681 (0,554 - 0,809)	0,008	0,045	0,474
RNASEL-201	0,838 (0,749 - 0,926)	5,0E ⁻⁷	0,387	0,540

En la Figura 59 se ilustran las seis isoformas con mayor significación estadística y potencial discriminativo, identificadas mediante el análisis de curvas ROC, cuando el estado predictivo es padecer EM.

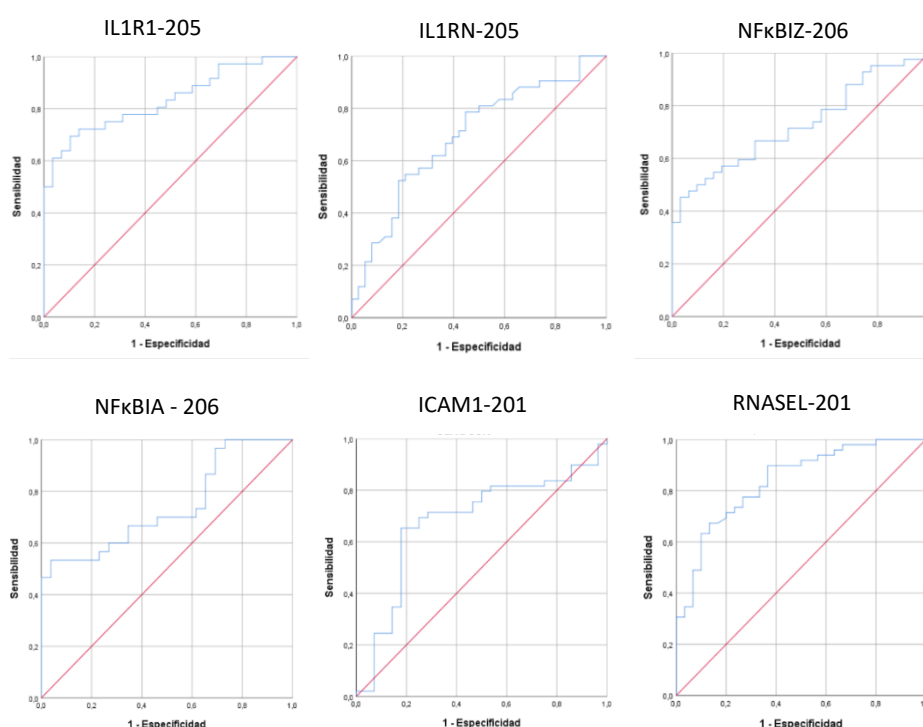


Figura 59. Representación de las curvas ROC de las isoformas IL1R1-201, IL1RN-205, NFKBIZ-206, NFKBIA-206, NFKBIA-206 ICAM-206, y RNASEL-201, donde el estado predictivo era el de padecer EM. Las áreas bajo la curva fueron de 0,832, 0,694, 0,727, 0,741, 0,681 y 0,838, respectivamente.

Resultados

Adicionalmente, se realizó un segundo análisis ROC definiendo como estado predictivo la condición de control sano, con el fin de identificar aquellas isoformas cuya expresión elevada o patrón diferencial se asocie con la ausencia de enfermedad. En este caso, se identificaron dos isoformas significativas, lo que sugiere que determinados perfiles de expresión también podrían ser útiles para descartar la presencia de EM en un contexto diagnóstico (Tabla 37). Sin embargo, el valor máximo de Youden fue nuevamente inferior a 0,6, lo que indica una capacidad discriminativa moderada.

Tabla 37. Área bajo la curva (AUC) asociada del análisis ROC cuando el estado predictivo se definió como NO padecer EM para las isoformas con resultados estadísticamente significativos. Se incluyen los límites superior e inferior del intervalo de confianza (IC) al 95 %, así como los valores de p, el punto de corte (cut-off) y el índice de Youden máximo.

Isoforma	AUC (95 % IC)	p-valor	Cut-off óptimo	Youden máximo
CCL3-204	0,665 (0,540 - 0,791)	0,015	0,133	0,459
PURA-201	0,820 (0,727 - 0,913)	4,0E-6	0,823	0,529

En la Figura 60 se ilustran las dos isoformas con mayor significación estadística y potencial discriminativo, identificadas mediante el análisis de curvas ROC cuando el estado predictivo es no padecer EM.

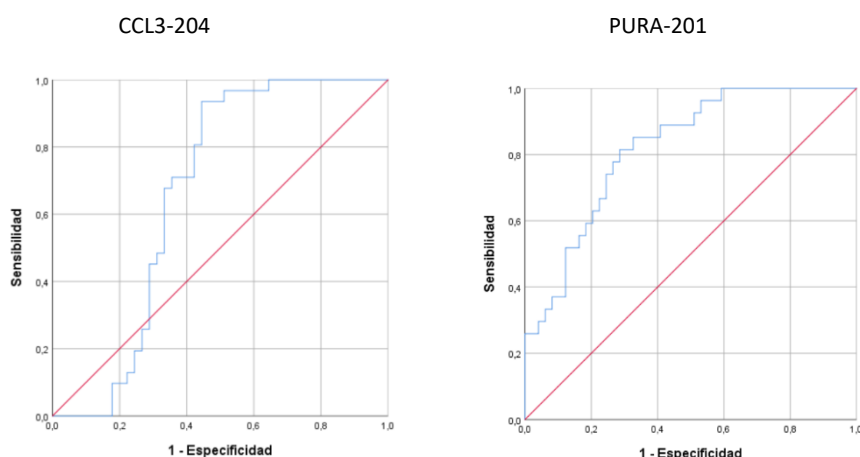


Figura 60. Representación de las curvas ROC de dos de las isoformas donde el estado predictivo era no padecer EM: CCL3-204 y PURA-201. Las áreas bajo la curva fueron de 0,665 y 0,820, respectivamente.

Con la intención de mejorar el poder discriminativo, se decidió combinar los ocho biomarcadores para evaluar su potencial diagnóstico conjunto. En un primer intento, el modelo combinado no ofreció buenos resultados, probablemente debido a la

colinealidad entre algunas variables. Para mejorar el modelo, se seleccionaron únicamente los tres biomarcadores con mayor significación en los análisis ROC individuales previos: IL1R1-205, PURA-201 y RNASEL-201.

Finalmente, el modelo combinado mostró un rendimiento discriminativo excelente, con un área bajo la curva (AUC) de 0,907 ($p = 7,6E^{-5}$) y un índice de Youden de 0,837. Estos resultados destacan el valor potencial de los biomarcadores seleccionados como herramienta diagnóstica para la identificación de pacientes con EM (Tabla 38 y Figura 61).

Tabla 38. Rendimiento diagnóstico del modelo combinado del análisis ROC con los tres biomarcadores seleccionados. Se muestra el área bajo la curva (AUC), intervalo de confianza (IC) al 95 %, el valor p asociado, el punto de corte óptimo (cut-off) y el índice de Youden máximo

Modelo combinado	AUC (95 % IC)	p-valor	Cut-off óptimo	Youden máximo
IL1R1-205 RNASEL-201 PURA-201	0,907 (0,772 – 1,000)	$7,6E^{-5}$	0,257	0,837

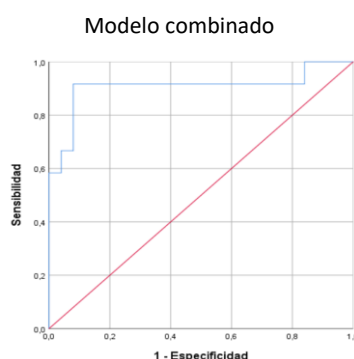


Figura 61. Representación de la curva ROC del modelo combinado por las isoformas IL1R1-205, RNASEL-201 y PURA-201. Área bajo la curva fueron de 0,907 y $p = 7,6E^{-5}$

4.4.6. Capacidad de las isoformas seleccionadas para la estratificación de pacientes mediante curvas ROC

Con el objetivo de explorar el potencial de ciertos biomarcadores para discriminar entre las formas EMRR y EMSP, se seleccionaron las diez isoformas de ARN diferencialmente expresadas entre ambos grupos. Para evitar redundancias y posibles efectos de multicolinealidad, se realizó previamente un análisis de correlación entre estas isoformas, lo que permitió identificar seis isoformas correlacionadas. Por lo tanto, se

Resultados

seleccionaron las cuatro isoformas no redundantes para el análisis posterior: IL1R1-205, NFkB2-203, ELAC1-201 y PURA-201.

A continuación, se llevó a cabo un análisis ROC individual para cada isoforma. En todos los casos, el estado predictivo fue definido como EMRR, excepto para PURA-201, cuya expresión fue mayor en EMSP y, por tanto, se invirtió el criterio (estado predictivo = EMSP). Los resultados se muestran en la Tabla 39. Las isoformas IL1R1-205 y PURA-201 mostraron una excelente capacidad discriminativa, con AUC de 0,965 y 0,901 respectivamente, mientras que NFkB2-203 y ELAC1-201 presentaron un rendimiento diagnóstico más moderado (AUC = 0,732 y 0,745), (Figura 62).

Tabla 39. Área bajo la curva individual para cuatro isoformas en la comparación entre pacientes con EMRR y EMSP.

Isoforma	AUC (95 % IC)	p-valor	Cut-off óptimo	Youden máximo
IL1R1-205	0,965 (0,924-1)	6,6E-09	0,144	0,817
NFkB2-203	0,732 (0,615-0,849)	0,001	0,067	0,413
ELAC1-201	0,745 (0,618-0,873)	0,001	0,031	0,430
PURA-201	0,901 (0,817-0,985)	7,8E-08	0,830	0,744

Se presentan el área bajo la curva (AUC) con su intervalo de confianza al 95 %, el valor p asociado, el punto de corte óptimo (cut-off) determinado según el índice de Youden y el valor máximo de dicho índice

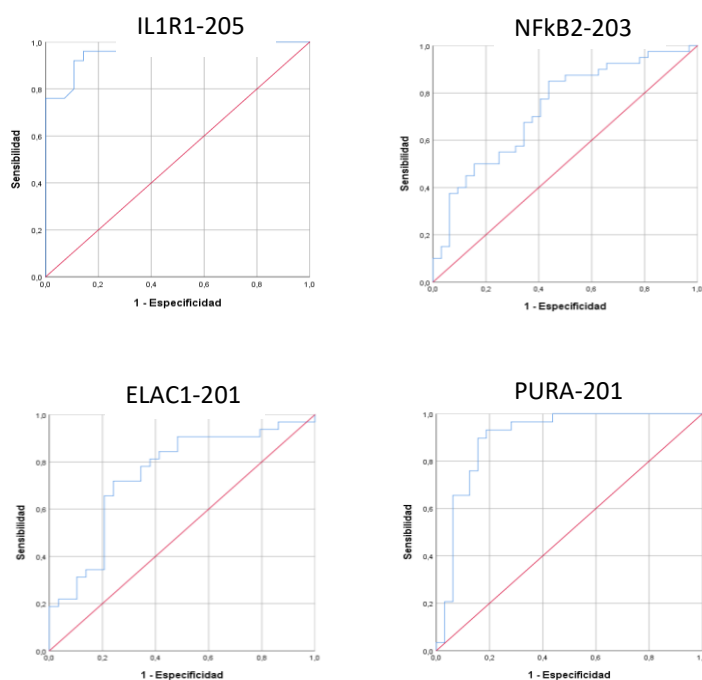


Figura 62. Representación de las curvas ROC de las isoformas IL1R1-205, NFkB2-203, ELAC1-201 y PURA-201, en el análisis de conversión de EMRR a EMSP. Las áreas bajo la curva fueron de 0,965, 0,694, 0,732, 0,745 y 0,901, respectivamente

Para evaluar si la combinación de múltiples marcadores podía mejorar la estratificación de pacientes, se construyó un modelo multivariante que integraba las cuatro isoformas seleccionadas. El análisis ROC de este modelo combinado obtuvo un AUC de 0,962, con un índice de Youden máximo de 0,788 y un valor de $p = 1,1E^{-5}$, lo que muestra una excelente capacidad de discriminación entre EMRR y EMSP, pero no mejora la capacidad discriminativa de IL1R1-205 aislada. La evaluación de un modelo más reducido, incluyendo únicamente las dos isoformas con mayor significación individual (IL1R1-205 y PURA-201) mostró un rendimiento muy similar al de ILR1-205, con un AUC de 0,964, un índice de Youden de 0,805 y un valor de $p = 8,6 E^{-8}$, lo que sugiere que la isoforma IL1R1-205 por sí sola presenta el mejor valor discriminativo para la estratificación clínica entre ambas formas de EM.

4.4.7. Expresión diferencial de las isoformas en los pacientes con OIND

Aunque somos conscientes de la limitación que supone el reducido tamaño muestral del grupo OIND y la escasa disponibilidad de muestras que permitió el análisis de sólo 25 isoformas, consideramos relevante evaluar la expresión génica en este grupo en comparación con los controles sanos y los pacientes con EMRR.

4.4.7.a. Expresión diferencial de las isoformas en los pacientes con OIND versus HC

Esta comparación nos permite identificar alteraciones asociadas a enfermedad neuroinflamatoria, independientemente de su etiología específica y detectar posibles biomarcadores útiles para el diagnóstico diferencial de EM. Así mismo, contribuye a la comprensión de los mecanismos moleculares generales implicados en la neuroinflamación, como rutas de señalización, procesos celulares o factores reguladores presentes en OIND, pero ausentes en condiciones fisiológicas.

En los pacientes con OIND se observó una sobreexpresión diferencial, respecto a los controles sanos, de las siguientes isoformas mediante el test de Mann-Whitney y ajuste de la significación por método de Benjamini-Hochberg (Figura 63):

- Citoquinas y moléculas asociadas: IL1 β -206 ($p_{adj}=7,0E^{-05}$), IL1 β -207 ($p_{adj}=5,3E^{-04}$), IL1 β -208 ($p_{adj}=2,0E^{-04}$), NLRP3-206 ($p_{adj}=2,2E^{-04}$) y TNF-208 ($p_{adj}=9,6E^{-04}$)

Resultados

- Quimiocinas: CXCL1-201 ($p_{\text{adj}}=5,1\text{E}^{-04}$), CXCL3-204 ($p_{\text{adj}}=1,4\text{E}^{-04}$)
- Moléculas de adhesión: ICAM1-201 ($p_{\text{adj}}=0,003$)
- Endonucleasa: ELAC1-201 ($p_{\text{adj}}=0,006$)

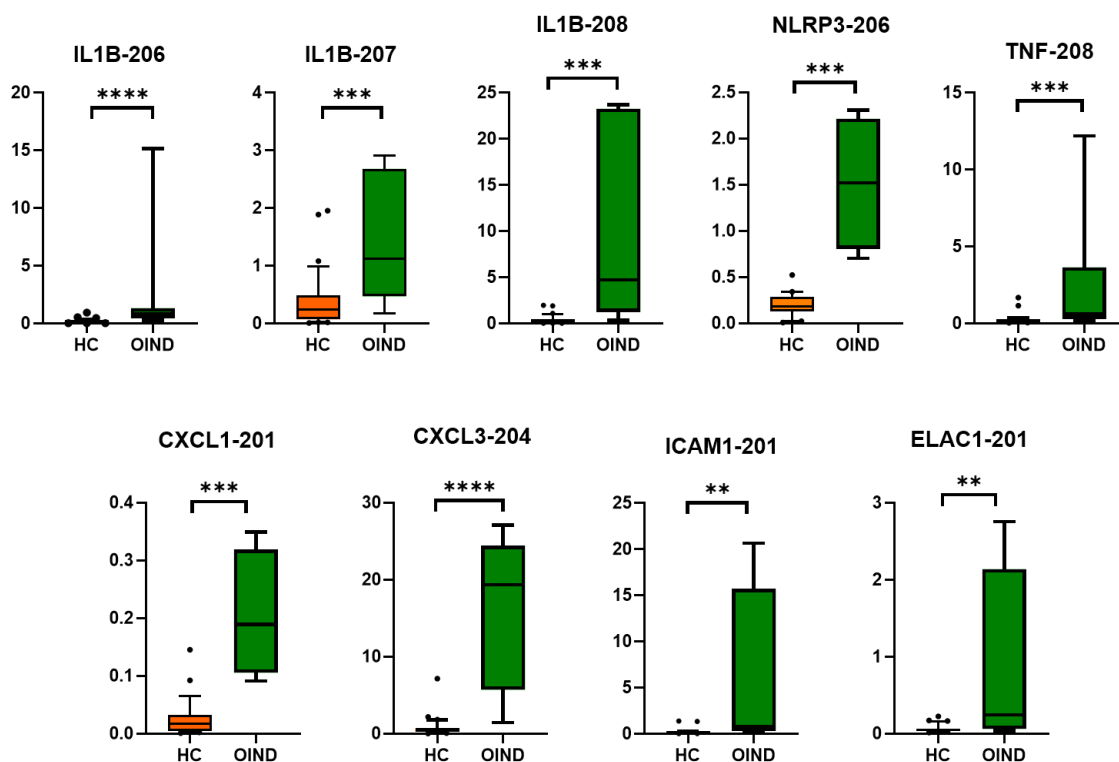


Figura 63. Expresión diferencial de las isoformas en los pacientes con OIND versus HC. Los niveles de expresión fueron determinados mediante qPCR en la muestra de validación. En cada diagrama de cajas, la línea horizontal dentro de la caja representa la mediana. Los límites superior e inferior de la caja indican los percentiles 25 y 75, y los bigotes (whiskers) se extienden hasta los percentiles 10 y 90. ** $p_{\text{adj}} < 0,01$; *** $p_{\text{adj}} < 0,001$; **** $p_{\text{adj}} < 0,0001$

4.4.7.b. Expresión diferencial de las isoformas en los pacientes con OIND versus pacientes con EMRR

Esta comparación tiene como objetivo facilitar el diagnóstico diferencial con la EM. OIND y EMRR pueden compartir síntomas clínicos y características en neuroimagen, por lo que encontrar perfiles de *splicing* específicos puede ayudar a diferenciarlas de forma más objetiva y temprana.

Las isoformas con mayor potencial discriminativo entre pacientes con EMRR y aquellos con OIND fueron las siguientes, encontrándose sobre expresadas en los pacientes con OIND (Figura 64):

- IL1 β -206 ($p_{\text{adj}}=3,5E^{-04}$), IL1 β -207 ($p_{\text{adj}}=0,014$), IL1 β -208 ($p_{\text{adj}}=2,8E^{-04}$) y NLRP3-206 ($p_{\text{adj}}=3,2E^{-04}$) y TNF-208 ($p_{\text{adj}}=0,028$)
- Quimiocinas: CXCL1-201 ($p_{\text{adj}}=0,003$) y CXCL3-204 ($p_{\text{adj}}=1,4E^{-05}$)

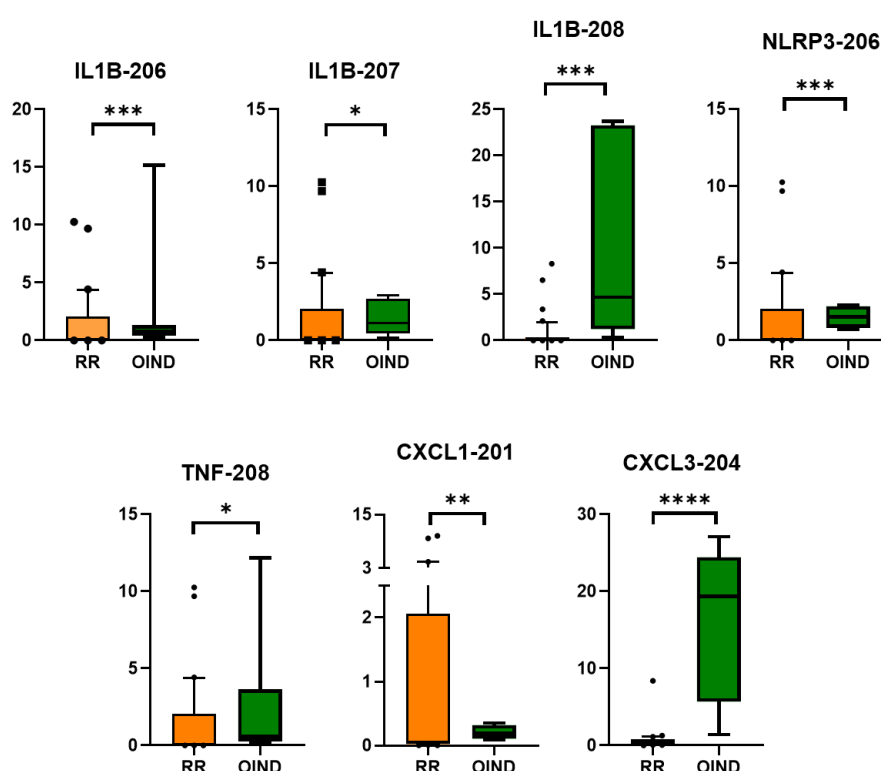


Figura 64. Expresión diferencial de las isoformas en los pacientes con OIND versus pacientes con EMRR. Los niveles de expresión fueron determinados mediante qPCR en la muestra de validación. En cada diagrama de cajas, la línea horizontal dentro de la caja representa la mediana. Los límites superior e inferior de la caja indican los percentiles 25 y 75, y los bigotes (whiskers) se extienden hasta los percentiles 10 y 90. * $p_{\text{adj}} < 0,05$; ** $p_{\text{adj}} < 0,01$; *** $p_{\text{adj}} < 0,001$; **** $p_{\text{adj}} < 0,0001$

4.4.7.c. Evaluación de la capacidad diagnóstica diferencial entre pacientes con EMRR y aquellos con OIND, mediante curvas ROC

Con el objetivo de evaluar la capacidad discriminativa de las isoformas de procesamiento alternativo entre pacientes con EMRR y aquellos con OIND, se realizó un

análisis ROC tomando como estado predictivo la condición OIND. En la Tabla 40 se presenta el resultado de las AUC de las cinco isoformas que resultaron significativas: IL1B-206, IL1B-208, NLRP3-206, CXCL1-201 y CXCL3-204.

Tabla 40. Área bajo la curva individual para cinco isoformas en la comparación entre pacientes con EMRR y OIND.

Isoforma	AUC (95 % IC)	p-valor	Cut-off óptimo	Youden máximo
IL1B-206	0,929 (0,813-1)	0,019	0,517	0,842
IL1B-208	0,877 (0,710-1)	0,040	0,934	0,737
NLRP3-206	1 (1-1)	0,006	1,069	1
CXCL1-201	0,964 (0,887-1)	0,011	0,123	0,947
CXCL3-204	1 (1-1)	0,006	4,211	1

Se presentan el área bajo la curva (AUC) con su intervalo de confianza al 95 %, el valor p asociado, el punto de corte óptimo (cut-off) determinado según el índice de Youden y el valor máximo de dicho índice

Las isoformas NLRP3-206 y CXCL3-204 mostraron valores de AUC y Youden máximo iguales a 1, como se representa en la Figura 65. Si bien estos resultados podrían sugerir una excelente capacidad discriminativa, deben interpretarse con cautela debido al tamaño reducido del grupo OIND. La clasificación perfecta obtenida probablemente refleja un caso de sobreajuste (*overfitting*), en el cual el modelo se ajusta excesivamente a las características específicas de un conjunto muy limitado de datos, perdiendo capacidad de generalización (Babiyak, 2004). Por tanto, se considera necesario validar estos resultados en una cohorte independiente con mayor representación del grupo OIND antes de establecer conclusiones firmes sobre su utilidad diagnóstica diferencial.

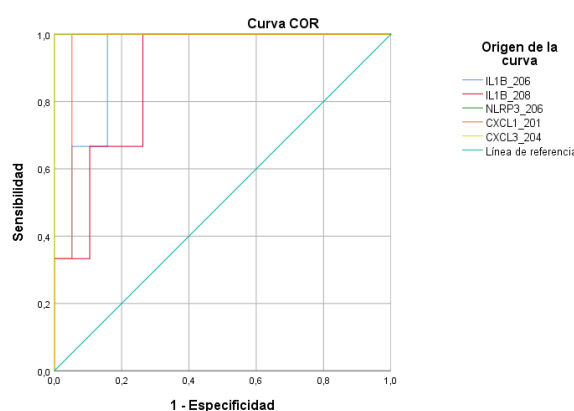


Figura 65. Curvas ROC individuales de cinco biomarcadores (IL1B-206, IL1B-208, NLRP3-206, CXCL1-201 y CXCL3-204) para la discriminación entre pacientes con EMRR y OIND.

4.4.8. Predicción topológica y señalización de isoformas de receptores sobreexpresadas en EM

La diferenciación entre isoformas solubles y de membrana es especialmente importante en el caso de los receptores, ya que el procesamiento alternativo del ARN mensajero puede originar variantes que carezcan del dominio transmembrana y actúen como "receptores señuelo" (*decoy receptors*), capaces de unirse al ligando y modular la señalización intracelular al impedir su interacción con los receptores completos. Por el contrario, en las citoquinas, quimiocinas y en la mayoría de las moléculas de adhesión, esta distinción no sería tan relevante, ya que suelen existir exclusivamente como formas secretadas o generar formas solubles a través de procesos de escisión proteolítica (*shedding*), y no mediante procesamiento alternativo, como ocurre con los receptores.

Con el objetivo de explorar el posible papel funcional de las isoformas diferencialmente expresadas en pacientes con EM, se seleccionaron para análisis topológico aquellas correspondientes a receptores: IL1R1-205, IL1RN-205 y PLAUR-214.

IL1R1 presenta 12 isoformas codificadoras, de las cuales 7 contienen dominio transmembrana, y 5 son clasificadas como "*outside*", sin dominio transmembrana, compatibles con isoformas solubles. IL1R1-205 presenta un dominio transmembrana, lo que la define como una isoforma funcional de membrana, con capacidad de unirse a IL1 en el espacio extracelular y de transducir la señal, activando vías de señalización proinflamatoria en el interior celular.

En el caso de IL1RN, se identificaron 6 isoformas codificadoras: 4 compatibles con isoformas solubles, y 2 clasificadas como "*inside*", probablemente citoplasmáticas y no funcionales como receptores. IL1RN-205 es una de las isoformas solubles, sin dominio transmembrana, con una posible función reguladora al actuar como antagonista competitivo, uniéndose a IL1 y bloqueando su interacción con los receptores de membrana, modulando así la activación inflamatoria.

Finalmente, PLAUR presenta 2 isoformas codificadoras, ambas "*outside*" y sin dominio transmembrana, lo que sugiere un papel similar como formas solubles, posiblemente implicadas en regulación extracelular. La Figura 66 resume la topología y características señalizadoras predichas para cada isoforma.

Resultados

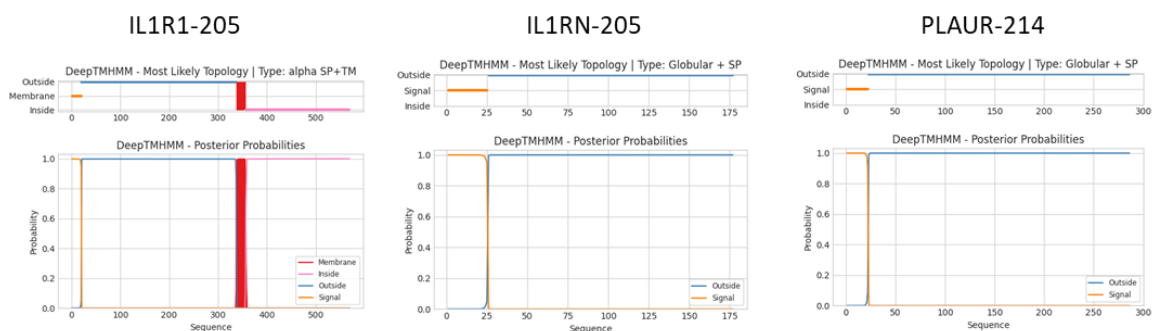


Figura 66. Análisis topológico de las isoformas IL1R1-205, IL1RN-205 y PLAUR-214 mediante DeepTMHMM. En la parte superior de cada panel se muestra la topología más probable predicha (tipos y distribución de dominios), y en la inferior, el perfil de probabilidad por residuo para cada estado topológico (extracelular, membrana, citoplasmático y señal). IL1R1-205: presenta un dominio transmembrana (región roja) y un péptido señal (línea naranja), IL1RN-205: clasificada como "outside", sin dominio transmembrana y con péptido señal, compatible con una forma soluble secretada al espacio extracelular. PLAUR-214: clasificada como "outside", sin dominio transmembrana y con péptido señal.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5. DISCUSIÓN

La EM tiene una naturaleza compleja que dificulta su diagnóstico. Por ello, numerosos investigadores coinciden en que existe una necesidad indiscutible de biomarcadores para el diagnóstico temprano, la predicción de brotes en la EMRR, la monitorización de su progresión y la evaluación de la respuesta a los diferentes tratamientos disponibles (Chase Huizar et al., 2020).

Para el descubrimiento de nuevos biomarcadores se sigue una estrategia basada en la aplicación de métodos de análisis -ómicos, sin hipótesis predefinida, para llevar a cabo un análisis exhaustivo de marcadores en un número reducido de muestras, buscando comprender la base molecular de la EM e identificar candidatos a biomarcadores. Posteriormente, se lleva a cabo la validación de un conjunto reducido de biomarcadores candidatos en muestras más amplias mediante el uso de técnicas más accesibles y fáciles de implementar.

El principal problema de las técnicas -ómicas es que la clínica del ingente volumen de datos genómicos, transcriptómicos y proteómicos generados sigue siendo limitada, lo que ha motivado el desarrollo de herramientas en ciencia de datos para extraer relaciones biológicamente significativas y facilitar la identificación de biomarcadores (Chase Huizar et al., 2020).

El presente trabajo se ha centrado en el estudio de proteínas séricas e isoformas de procesamiento alternativo del ARN como posibles biomarcadores diagnósticos de la EM o como marcadores de actividad de la enfermedad. Para ello, ha seguido un abordaje experimental con una estrategia escalonada o “triangular” para el descubrimiento de biomarcadores (Geyer et al., 2017). En la fase inicial de descubrimiento, empleamos técnicas proteómicas y transcriptómicas para analizar la mayor cantidad posible de candidatos a biomarcadores en un grupo pequeño y bien caracterizado de pacientes no tratados, un grupo frecuentemente subrepresentado en la investigación de biomarcadores. El objetivo fue generar datos amplios y no sesgados que orientaran los análisis posteriores más dirigidos. Los biomarcadores candidatos identificados en esta

fase inicial fueron posteriormente validados en muestras independientes más amplias de pacientes con EM no tratados.

Análisis de proteínas séricas como biomarcadores

En el primer bloque de este trabajo, centrado en el estudio del proteoma, se aborda una de las principales limitaciones actuales en la investigación de bio

marcadores en EM: el conocimiento aún limitado sobre las proteínas séricas y plasmáticas asociadas a la enfermedad. Esta escasez de información se debe, en gran parte, a la baja concentración de muchas proteínas en suero o plasma, lo que dificulta su detección mediante inmunoanálisis convencionales. Además, persiste la incertidumbre sobre la capacidad de los biomarcadores séricos para reflejar con fidelidad los mecanismos patogénicos que tienen lugar en el SNC a lo largo del curso de la enfermedad. En este contexto, el LCR continúa siendo el fluido biológico de referencia para estudios proteómicos orientados al descubrimiento de biomarcadores en EM, ya que refleja de forma directa los procesos inflamatorios y neurodegenerativos en el SNC. No obstante, la facilidad y menor invasividad de la obtención de muestras de sangre ha impulsado el análisis proteómico del suero como una alternativa prometedora para la identificación de biomarcadores, con potencial para aportar información relevante sobre los procesos patológicos subyacentes (Tremlett et al., 2015).

La fase exploratoria de este estudio se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución, una técnica que permite eliminar proteínas de alta y media abundancia y realizar un fraccionamiento exhaustivo de péptidos, lo que incrementa notablemente la sensibilidad de detección. Esta aproximación permitió identificar proteínas candidatas con diferencias marcadas en su abundancia en una cohorte bien caracterizada de pacientes con EM no tratados. Posteriormente, algunos de estos candidatos fueron validados mediante enzimoimmunoanálisis en una cohorte independiente más amplia, lo que refuerza la solidez y reproducibilidad de los hallazgos. Esta estrategia, ampliamente aceptada en estudios de proteómica, busca maximizar la identificación de biomarcadores con potencial clínico, superando las limitaciones derivadas del tamaño muestral y de la variabilidad biológica inherente a la EM.

Una de las principales fortalezas de nuestro enfoque radica en la selección de pacientes no tratados, lo que elimina posibles interferencias del tratamiento sobre la expresión proteica y garantiza una evaluación más precisa de los biomarcadores. Otro punto fuerte de este estudio es la aplicación de criterios estrictos para la identificación de proteínas desreguladas, exigiendo un cambio mínimo de al menos el doble en la abundancia proteica entre los grupos comparados. Finalmente, la validación en una muestra independiente mediante ELISA contribuyó a reducir el riesgo de falsos positivos y a aumentar la robustez de los resultados. Un análisis de potencia post hoc confirmó que la muestra contaba con suficiente potencia estadística para detectar efectos de gran magnitud en esta fase de validación.

A continuación, se discuten las implicaciones funcionales de las proteínas identificadas, su posible papel en la fisiopatología de la enfermedad y su utilidad como herramientas diagnósticas o pronósticas.

En la fase exploratoria, se identificaron 13 proteínas desreguladas en pacientes con EM en comparación con los controles sanos. Estas proteínas están implicadas en vías biológicas clave, particularmente relacionadas con funciones del sistema inmune innato, como la *degranulación de neutrófilos*, la *fagocitosis mediada por FCGR3A* y la *regulación de la cascada del complemento*, lo que refuerza su potencial valor diagnóstico. Además, dos de estas 13 proteínas, junto con otras dos adicionales, mostraron diferencias significativas entre pacientes con EMPP y aquellos con formas clínicas de inicio en brotes.

De las 15 proteínas desreguladas en total, 12 pudieron ser evaluadas en la fase de validación mediante ELISA. Es importante señalar que la UHPLC-HRMS permite la detección de péptidos fraccionados derivados de proteínas, mientras que los ELISA miden proteínas maduras, que pueden haber sufrido modificaciones postraduccionales. Por ello, no resulta inesperado observar ciertas discrepancias entre los resultados obtenidos en ambas fases. Un ejemplo ilustrativo es la proteína PCSK9, previamente identificada en otros estudios proteómicos como menos abundante en pacientes con EM frente a individuos con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias (Liu et al., 2022). En nuestra fase exploratoria, PCSK9 mostró una menor abundancia relativa en EMPP en comparación con EMRR, aunque esta diferencia no se replicó de forma significativa en la fase de validación.

Las diferencias más consistentes en la fase de validación entre pacientes con EM y controles sanos fueron el aumento de PRDX6, FCGR3A y APEH, principalmente en pacientes con EMPP; el incremento de BST1 en pacientes con ROMS; y la disminución de CFHR5 y MST1 en pacientes con ROMS, siendo esta última también significativamente menor en ROMS frente a EMPP. Además, los niveles séricos de APEH y MST1 se correlacionaron con la gravedad de la EM, evaluada mediante la escala MSSS.

La peroxirredoxina 6 (PRDX6) es una enzima conocida por sus propiedades antioxidantes, así como por su actividad peroxidasa, fosfolipasa A2 y aciltransferasa (Chen et al., 2000; Liao et al., 2021), todas ellas potencialmente relevantes en el contexto de la EM. En nuestro estudio, se observaron niveles séricos significativamente elevados de PRDX6 en pacientes con todas las formas clínicas de EM en comparación con los controles sanos, con incrementos particularmente marcados en pacientes con EMPP. Estos hallazgos sugieren un papel clave de PRDX6 en la patogénesis de la EM, un aspecto que aún no ha sido ampliamente explorado.

Estudios previos han reportado niveles elevados de PRDX6 en suero de pacientes con EM y con NMOSD en comparación con OIND (Uzawa et al., 2020). A nivel tisular, se ha descrito una expresión significativamente elevada de PRDX6 en las lesiones crónicas de tejido cerebral fijado en formalina de pacientes con EM, asociada a una marcada proliferación de astrocitos (Ly et al., 2011). De forma concordante, otros autores han identificado una fuerte expresión de PRDX6 en células tipo astrocito dentro de las lesiones de EM, lo cual se asoció con una menor disrupción de la BHE (Yun et al., 2015).

Varios autores sugieren que uno de los posibles mecanismos mediante los cuales PRDX6 podría ejercer un efecto beneficioso en la EM es a través de su acción neuroprotectora frente al estrés oxidativo, eliminando el exceso de ROS en el SNC durante la enfermedad (Uzawa et al., 2020; Xue et al., 2024). Además, la administración exógena de PRDX6 en modelos EAE se ha mostrado capaz de reducir la producción de ROS y preservar la integridad de la BHE (Lunin et al., 2023), limitando así la infiltración de células inmunitarias periféricas y atenuando la neuroinflamación (Yun et al., 2015). También se ha demostrado que PRDX6 modula la respuesta inmune al disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias y favorecer la liberación de citoquinas antiinflamatorias

(Parfenyuk et al., 2023), lo que podría contribuir a mitigar la inflamación crónica que impulsa la progresión de la EM.

En conjunto, estos hallazgos respaldan la hipótesis de que los niveles elevados de PRDX6 en suero de pacientes con EM observados en nuestro estudio podrían representar una respuesta compensatoria frente a los procesos neurodegenerativos y oxidativos que caracterizan la EM. La asociación significativa entre los niveles de PRDX6 y la progresión de la enfermedad evaluada mediante la escala EDSS, refuerza su potencial como biomarcador pronóstico y como posible diana terapéutica para reducir la inflamación y el daño oxidativo en la enfermedad (Xue et al., 2024).

Tras analizar el papel de PRDX6 en la EM, se exploró también la implicación de otras proteínas desreguladas identificadas en nuestro estudio, como FCGR3A. Esta proteína, también conocida como CD16A, es el receptor de la fracción constante Fc de la IgG. Al unirse a los complejos de antígeno-IgG de la superficie celular, se activa y desencadena la lisis de las células cubiertas con anticuerpos. A continuación, sufre un corte proteolítico y se libera en su forma soluble (Jing et al., 2015). Hasta donde sabemos, existen muy pocos estudios sobre los niveles de FCGR3A soluble (sFCGR3A) en la EM. Un estudio proteómico reciente en pacientes de China con EM encontró que los niveles de sFCGR3A en plasma eran menos abundantes que en los controles sanos (Yang et al., 2024), aunque este estudio no ha sido validado. Por el contrario, el FCGR3A transmembrana ha sido ampliamente explorado, ya que CD16 se expresa en altos niveles en monocitos/macrófagos no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺), células NK CD16⁺CD56^{dim} y células T $\gamma\delta$ (L. Li et al., 2022), además de en la microglía, células precursoras de oligodendrocitos y oligodendrocitos inmaduros (Nakahara & Aiso, 2006).

Al contrario del estudio de Yang *et al.* 2024, en nuestro estudio, los pacientes, particularmente aquellos con EMPP, mostraron niveles séricos significativamente elevados de sFCGR3A en comparación con los controles sanos, con una asociación significativa con la puntuación en la escala EDSS. Aunque el origen exacto de sFCGR3A en estos pacientes aún no se ha determinado, es probable que derive de la escisión proteolítica de este receptor en la superficie de monocitos no clásicos o células NK CD16⁺CD56^{dim} tras su activación.

Esta hipótesis se ve respaldada por estudios previos que han descrito un aumento de monocitos no clásicos que expresan FCGR3A en pacientes con EM frente a controles (Chuluundorj et al., 2014; Gjelstrup et al., 2018; Haschka et al., 2020). Estos monocitos, al activarse, presentan un fenotipo inflamatorio y son altamente eficaces en la activación de células T, migran con facilidad a través de la BHE y pueden contribuir a su disrupción (Ipavec et al., 2024). En cuanto a la expresión de FCGR3A en las células NK en la EM, la evidencia es más heterogénea. Algunos estudios han descrito una disminución en la actividad citotóxica de las células NK CD16⁺ en pacientes con EMRR, correlacionada con la actividad clínica y radiológica (Kucuksezer et al., 2021). Sin embargo, otros trabajos no han encontrado diferencias significativas en los porcentajes de células NK CD16⁺ entre pacientes con EMRR no tratados y controles (Khani et al., 2022), o incluso se han descrito porcentajes más altos de estas células NK en pacientes con EMPP y EMSP en comparación con sujetos sanos (Plantone et al., 2013).

Nuestros hallazgos sugieren que el sFCGR3A podría desempeñar un papel hasta ahora poco reconocido en la fisiopatología de la EMPP. Sus niveles elevados podrían reflejar una activación inmune aumentada, mediada por células del sistema inmune innato, que contribuiría a la progresión de los procesos neurodegenerativos.

Asimismo, nuestro análisis identificó otras dos proteínas con una abundancia significativamente mayor en suero de pacientes con EM en comparación con los controles sanos.

La tercera proteína con niveles elevados en todas las formas clínicas de EM fue la acilpeptidasa APEH. Aunque hasta la fecha ningún estudio previo haya establecido una conexión directa entre esta proteína y la EM, la asociación significativa observada entre sus niveles séricos y la puntuación en la escala MSSS sugiere un posible papel en la fisiopatología, particularmente en fases progresivas. APEH es una enzima que degrada proteínas bacterianas y mitocondriales mediante hidrólisis, liberando péptidos acetilados. Se ha descrito que estos péptidos pueden actuar como señales quimioatrayentes para fagocitos, favoreciendo así la inducción de respuestas inflamatorias (Nguyen & Pei, 2005). Asimismo, se ha propuesto que los productos de la peroxidación lipídica generados durante procesos inflamatorios pueden unirse a APEH e inhibir su actividad, lo que la posiciona como un posible biomarcador del estrés oxidativo

(Tyler et al., 2021). En este contexto, se requiere profundizar en su estudio para esclarecer si los niveles elevados de APEH en suero reflejan una respuesta inflamatoria activa desencadenada por los péptidos acetilados, o por el contrario, una inhibición funcional de productos de peroxidación lipídica que contribuya al desequilibrio redox y a la progresión de la enfermedad.

Por su parte, el antígeno 1 de células del estroma de la médula ósea (BST1), también conocido como CD157, fue la última proteína con una abundancia significativamente mayor en pacientes con EM frente a controles. BST1 se expresa en células mieloides, células madre hematopoyéticas y células neuronales (Lopatina et al., 2020) y participa en la adhesión y migración de leucocitos (Ortolan et al., 2019). Su expresión en células endoteliales de la microvasculatura cerebral contribuye al mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la BHE, mientras que su alta expresión en células del sistema inmune innato facilita la migración leucocitaria hacia el SNC, promoviendo así la neuroinflamación (Lopatina et al., 2020). En nuestro estudio, encontramos que los niveles séricos de BST1 estaban elevados en pacientes con ROMS en comparación con controles, lo que podría reflejar la activación de una respuesta inmune innata responsable de la inflamación en el cerebro. Esto es especialmente relevante en el contexto de la EM, ya que las células mieloides desempeñan un papel fundamental en los procesos inflamatorios que promueven la desmielinización y la neurodegeneración.

La asociación de BST1 con otras enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide y ciertos tipos de cáncer (Kaisho et al., 1994; Ortolan et al., 2019) refuerza su potencial como biomarcador y posible diana terapéutica en EM, particularmente en formas con mayor componente inflamatorio como la EMRR.

En contraste con las proteínas previamente descritas, nuestro estudio también identificó dos proteínas con niveles séricos significativamente reducidos en pacientes con EM en comparación con los controles sanos: CFHR5 y MST1.

La proteína 5 relacionada con el factor H del complemento (CFHR5) desempeña un papel crucial en la regulación de la vía alternativa del complemento mediante su unión a C3b (Skerka et al., 2013). La disminución de sus niveles séricos en los pacientes con EM, especialmente en aquellos con formas de inicio en brotes, podría reflejar una desregulación del control del complemento, favoreciendo un entorno proinflamatorio

en el SNC. Esta observación es coherente con estudios que han implicado la activación del complemento en la patogénesis de la EM (Oechtering et al., 2024). Asimismo, en otras enfermedades autoinmunes también se ha descrito que tanto la deficiencia como la sobreactivación del sistema del complemento pueden contribuir al desarrollo y a la progresión de la enfermedad (Conigliaro et al., 2019; Zhang et al., 2021).

Por otro lado, los niveles séricos de la proteína estimuladora de macrófagos (MST1) mostraron un patrón diferencial respecto a otros biomarcadores; fueron significativamente más bajos en pacientes con EMRR en comparación con controles sanos y con otras formas clínicas de EM. Aunque el mecanismo exacto mediante el cual MST1 regula la respuesta inmune aún no se ha dilucidado, se sabe que MST1 participa en la modulación del sistema inmune innato (Shi & Zhou, 2017), en la regulación de la proliferación de células T naïve y en la protección frente al estrés oxidativo. Estudios en modelos murinos han demostrado que su deficiencia afecta al desarrollo y la función de las células T reguladoras en ratones (Du et al., 2014). Además, se ha descrito que MST1 también media la muerte celular inducida por estrés oxidativo en neuronas y astrocitos (S. J. Lee et al., 2014), así como la apoptosis de microglía (Yun et al., 2011).

Un estudio previo describió niveles elevados de MST1 en vesículas extracelulares derivadas de células T de pacientes con EMRR, asociándola con daño en la sustancia blanca (Torres Iglesias et al., 2023). En nuestro análisis proteómico, los niveles de MST1 en pacientes con EMRR fueron 2,547 veces superiores a los de los controles sanos, mientras que en la validación por ELISA resultaron inferiores a los controles y pacientes con otras formas clínicas de EM. Curiosamente, este hallazgo es coherente con los resultados de Torres Iglesias, ya que mientras las proteínas encapsuladas dentro de las VE no son detectadas por ELISA sin una lisis previa, durante el análisis proteómico, las muestras se sometieron a un proceso de sonicación y precipitación que provoca la lisis de las VE, permitiendo así la detección de estas proteínas.

No podemos determinar si la marcada disminución en los niveles séricos de MST1 observada en pacientes con EMRR contribuye directamente a la disfunción inmunitaria. Es posible que esta reducción favorezca un desequilibrio en las células T reguladoras, promoviendo un fenotipo T proinflamatorio que exacerbe la neuroinflamación.

Alternativamente, podría reflejar simplemente una redistribución intracelular hacia las VE derivadas de células T, o una combinación de ambos mecanismos.

Finalmente, los niveles séricos de APEH y MST1 mostraron una asociación significativa con las puntuaciones en la escala MSSS, y en el caso de MST1, también con la escala EDSS, lo que refuerza su potencial valor como biomarcadores pronósticos en la EM.

En resumen, este estudio ha identificado un conjunto de proteínas séricas con alteraciones significativas en pacientes con EM, muchas de las cuales están implicadas en procesos clave como la inflamación, el estrés oxidativo, la regulación inmunitaria, la activación del complemento y la disfunción de la BHE. Estos hallazgos no solo refuerzan el papel central de estas vías en la fisiopatología de la enfermedad, sino que también destacan el potencial de estas proteínas como biomarcadores séricos para la caracterización fenotípica y el seguimiento clínico de la EM.

En términos generales, según lo mencionado en la literatura, todas las proteínas analizadas, excepto la PRDX6, parecen promover la neuroinflamación y el estrés oxidativo, por lo que podrían considerarse biomarcadores potenciales de la progresión de la enfermedad. En contraste, el aumento de PRDX6 podría reflejar mecanismos compensatorios de neuroprotección frente al estrés oxidativo.

No obstante, es importante considerar que los perfiles proteicos en suero son altamente dinámicos y están sujetos a múltiples influencias ambientales y fisiológicas (Jacobs et al., 2024; Sen et al., 2021), además de carecer de especificidad tisular o celular (Tremlett et al., 2015). Por ello, la interpretación de los resultados debe realizarse en el contexto de fenotipos clínicos bien definidos, como se ha hecho en este estudio. Aunque el diseño transversal limita la posibilidad de establecer relaciones causales o evaluar cambios longitudinales, los hallazgos presentados constituyen una base sólida para futuras investigaciones. En particular, estudios longitudinales permitirán validar el valor pronóstico de estos biomarcadores y explorar su utilidad en la monitorización de la progresión de la enfermedad y la respuesta terapéutica.

Análisis de isoformas de procesamiento alternativo del ARN en PBMC como biomarcadores

Las variantes generadas por procesamiento alternativo han sido en gran medida subestimadas, ya que tradicionalmente se ha asumido que muchas moléculas existen como una única forma proteica. Sin embargo, el desarrollo de tecnologías genómicas de alto rendimiento y de herramientas de bioinformática ha revelado que la mayoría de los genes están sujetos a procesamiento alternativo, lo que da lugar a múltiples isoformas con posibles funciones distintas, que podrían contribuir a la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y monitorización de la EM.

La cantidad potencial de combinaciones de isoformas de genes expresadas incluso en un solo tipo celular es abrumadora. Esta complejidad aumenta aún más si consideramos la variedad de tipos celulares que expresan cada gen, lo que hace que determinar la función de cada isoforma sea un desafío considerable. La expresión diferencial de isoformas generadas por procesamiento alternativo del ARN es un mecanismo clave para aumentar la diversidad proteica sin necesidad de aumentar el número de genes. Dependiendo del contexto celular, del tipo celular o del estado fisiológico, este proceso puede dar lugar a proteínas con funciones distintas, incluso opuestas, o bien impedir su traducción. Por tanto, es esencial aplicar enfoques genómicos y proteómicos para comprender mejor estos patrones de expresión.

En nuestra fase transcriptómica exploratoria, el análisis de agrupamiento revela una clara separación entre los grupos de pacientes con EM y los controles sanos. Mientras que los pacientes con EMRR muestran una sobreexpresión predominante de genes asociados a vías inmunitarias e inflamatorias, aquellos con EMSP sobreexpresan tanto genes asociados a vías inmunitarias e inflamatorias como asociados a senescencia celular. Por su parte, el grupo de pacientes con EMPP presenta un perfil diferencial caracterizado por la sobreexpresión de genes vinculados a procesos de neurodegeneración. Estos resultados sugieren que la forma EMPP posee una firma transcriptómica distintiva, asociada a rutas celulares diferentes de aquellas que predominan en las formas de inicio en brotes de la enfermedad.

En el mapa de calor que muestra las 50 isoformas de procesamiento alternativo con mayor expresión diferencial entre pacientes con EMRR y controles, se puede observar una notable heterogeneidad en la expresión génica entre los pacientes. Esta variabilidad podría deberse a diferencias en el historial terapéutico: aunque todos los individuos

estaban sin tratamiento en el momento del muestreo, algunos eran naïve, mientras que otros habían completado un período de lavado tras suspender una terapia previa. Estas diferencias podrían influir en la modulación del perfil transcriptómico, reflejando distintos grados de activación inmune residual. Esta misma tendencia se aprecia en la comparación entre pacientes con EMRR y EMPP, donde los pacientes naïve tienden a agruparse en un extremo del mapa, mientras que aquellos muestreados al final del período de lavado se agrupan junto a los pacientes con EMPP.

En el análisis funcional de las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre los pacientes con diferentes formas clínicas de EM y los controles sanos, observamos un enriquecimiento de rutas biológicas asociadas al sistema inmune, la inflamación, y la reparación del daño celular en las distintas formas clínicas de la EM, así como a procesos neurodegenerativos en las formas progresivas.

En la comparación entre pacientes con la forma clínica EMRR y los HC, las isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor expresión diferencial se agrupan en rutas funcionales asociadas a múltiples vías inflamatorias, incluyendo la señalización mediada por interleucinas (IL1, IL4, IL6, IL10) y las vías canónica y no canónica de NFκB. Este perfil de expresión sugiere un estado de inflamación activa con fuerte participación del sistema inmune adaptativo, característico de las fases iniciales de la EM. Aunque no se identificaron rutas directamente relacionadas con daño celular destaca la vía de *Guía axonal*, lo que podría indicar una disfunción temprana en la conectividad neuronal.

Este hallazgo es consistente con lo reportado por Tian et al., 2011, quienes mediante un estudio de microarrays de exones de genoma completo, encontraron 120 exones diferencialmente expresados y numerosos genes con procesamiento alternativo entre pacientes con EMRR sin tratamiento y controles sanos. Este grupo también identificó la *Guía axonal* como la ruta más significativamente alterada y postulan que, en EMRR, además de inflamación en el SNC, también existe una creciente evidencia de daño axonal que contribuye a la discapacidad. Los autores plantean que aún no está claro si el daño axonal es secundario a la desmielinización o resultado de un ataque directo de las células inmunitarias sobre los axones.

En la comparación entre formas EMSP y HC, las isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor expresión diferencial se agrupan en rutas de activación inflamatoria con un perfil más crónico, reflejado en *Señalización de TNF*, o la participación del *Sistema inmune innato*. También se observa agrupamiento de estas variantes en rutas de reparación del ADN, como la *Reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción (TC-NER)*, lo que sugiere un entorno celular más deteriorado y sometido a estrés sostenido. La presencia continuada de la ruta de *Guía axonal* en esta fase refuerza la hipótesis de un proceso neurodegenerativo progresivo superpuesto a la inflamación crónica.

Finalmente, las isoformas de procesamiento alternativo del ARN con mayor expresión diferencial entre pacientes con EMPP y HC, no se agrupan en torno a rutas inmunes e inflamatorias, sino que lo hacen en torno a aquellas asociadas a la *Reparación por escisión de bases defectuosa asociada con MUTYH* y a *Enfermedades por reparación en la escisión de bases*, implicadas en la respuesta al daño oxidativo. Aunque no se detectan rutas neurobiológicas específicas, la ausencia de señalización inmune y la presencia exclusiva de mecanismos de reparación celular apoyan un modelo patogénico en el que predominan los procesos degenerativos sobre la inflamación.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la idea de diferencias en el perfil de isoformas de procesamiento alternativo del ARN relacionadas con la patogenia subyacente a las diferentes formas clínicas de la EM. En las formas EMRR predominan isoformas asociadas a rutas inflamatorias, mientras que en los pacientes con formas EMSP existe una preponderancia de isoformas asociadas tanto a inflamación como a procesos neurodegenerativos. Finalmente, en los pacientes con EMPP se detecta un predominio de isoformas relacionadas con el daño celular y sus mecanismos de reparación, lo que sugiere una fase avanzada de disfunción tisular.

Asimismo, el análisis comparativo entre las distintas formas clínicas de EM reveló diferencias en las isoformas de procesamiento alternativo del ARN entre las formas de inicio en brotes y la EMPP. En particular, la comparación entre EMRR y EMPP, mostró una mayor representación de isoformas asociadas a rutas inflamatorias en los pacientes con EMRR, incluyendo *Señalización por interleucinas (IL1, IL4, IL10)*, así como *Señalización*

no canónica de NFκB. Estos hallazgos sugieren que los pacientes con EMPP presentan una menor expresión de isoformas vinculadas a la inflamación y a la activación del sistema inmune, lo que refleja un perfil transcriptómico menos inflamatorio en comparación con las formas EMRR.

La comparación entre EMSP y EMPP mostró un patrón similar al anterior. Las isoformas preponderantes en la EMSP se engloban en múltiples rutas inmunes, tanto innatas como adaptativas, así como en respuestas inflamatorias, incluyendo *señalización por interleucinas e interferones*. Por otra parte, algunas isoformas pertenecientes a la vía de *Guía axonal (codificadas por los genes de proteínas ribosomales RPL)* están sobreexpresadas en las formas EMPP, lo que podría reflejar un intento del sistema nervioso de reorganizar o compensar el daño neurodegenerativo más agresivo que se observa en estas formas.

En conjunto, estos datos apoyan un modelo patológico en EM en el que la inflamación activa y la señalización inmune predominan en las formas EMRR y EMSP, mientras que la forma EMPP se caracteriza por una atenuación de estos procesos y un perfil molecular más relacionado con el intento de reparación de una neurodegeneración ya establecida.

Son escasos los estudios que han evaluado la expresión de diferentes isoformas de procesamiento alternativo del ARN en la EM. En un estudio reciente de bases de datos de RNA-seq donde se analiza la expresión génica y el procesamiento alternativo en sustancia blanca de pacientes con EM y donantes sin enfermedades neurológicas, se identificaron más de 6.000 genes diferencialmente expresados y 2.721 genes con eventos de procesamiento alternativo. Se destacan genes relacionados con inflamación, neurogénesis y desarrollo del sistema nervioso. Además, se identificaron variantes de nucleótidos y vías metabólicas afectadas en lesiones específicas de EM. Los hallazgos sugieren biomarcadores potenciales para la clasificación de lesiones y objetivos terapéuticos para prevenir la progresión de la enfermedad y revertir el daño neuronal (Sak et al., 2024).

Un estudio previo (Paraboschi et al., 2015) respalda la hipótesis de que el procesamiento alternativo del ARN podría desempeñar un papel relevante en la etiopatogenia de la EM. Mediante un metaanálisis de perfiles de expresión génica en 190 pacientes con EM y 182

controles sanos, los autores identificaron un enriquecimiento significativo de genes implicados en el metabolismo del ARN. Entre ellos, destacaron alteraciones en genes reguladores del *splicing*, como *CELF1*, lo que sugiere una desregulación en los mecanismos de procesamiento alternativo del ARN en la enfermedad.

En este sentido, nuestro análisis transcriptómico también identifica expresión diferencial de numerosos genes implicados en el procesamiento alternativo del ARN, lo que subraya la importancia de este mecanismo en la regulación de la expresión génica y su posible implicación en la EM. Estos genes están asociados a rutas como *Metabolismo del ARN*, observadas en la comparación entre las formas de inicio en brotes y los controles sanos, así como entre EMSP y EMPP. Asimismo, se detectaron alteraciones en la vía de *Empalme del ARNm* en la comparación entre formas de inicio en brotes y controles, y en la ruta de *Procesamiento del ARNr* tanto entre formas de inicio en brotes y controles, como entre EMRR y EMSP, y entre EMSP y EMPP (Tablas suplementarias del Anexo II). Estos hallazgos sugieren que el procesamiento alternativo del ARN podría contribuir a la disfunción inmunológica y neurobiológica observada en la EM.

Dado el elevado número de isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial identificadas en la fase exploratoria, se seleccionó un conjunto representativo para su validación. Este conjunto incluye isoformas vinculadas a rutas clave en la fisiopatología de la EM, como la *Señalización y procesamiento de la IL1 (señalización del inflammasoma NLRP3)*, la *vía de señalización de la IL10*, y la *piroptosis*. Asimismo, se incluyeron en la validación *quimiocinas*, *moléculas de adhesión* y otras isoformas diferencialmente expresadas en las distintas comparaciones entre pacientes con EM y controles sanos, con el objetivo de profundizar en su posible implicación en los mecanismos inmunológicos y neurodegenerativos de la enfermedad.

Vía del inflammasoma NLRP3

El inflammasoma NLRP3 es un complejo multiprotéico, componente del sistema inmune innato, que interviene en la activación de la caspasa-1, el procesamiento y la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL1 β e IL18, y la piroptosis, un tipo de muerte celular inflamatoria. La activación del inflammasoma ocurre en respuesta bien a una infección microbiana o bien al daño celular. Esta activación tiene lugar por diversos estímulos y

eventos moleculares y celulares como son el flujo iónico, la disfunción mitocondrial, la producción de ROS, y el daño lisosomal (Kelley et al., 2019). Para la activación del inflammasoma se necesitan dos señales. La primera señal o *priming* permite la translocación del factor de transcripción NFκB al núcleo y la consecuente transcripción de los genes que codifican para el complejo proteico del NLRP3, la caspasa-1, y las citoquinas inmaduras pro-IL1β y pro-IL18. La segunda señal permite la activación de caspasa 1, que escinde las citoquinas inmaduras en sus formas biológicamente activas (IL1β e IL18).

Numerosos estudios han relacionado el inflammasoma NLRP3 con la EM (Barclay & Shinohara, 2017; Cui et al., 2022; Keane et al., 2018; Malhotra et al., 2020). Se han detectado niveles elevados de componentes del inflammasoma en pacientes con EM comparados con controles sanos, incluyendo caspasa-1, IL1β e IL18 en el LCR y sangre periférica (Mamik & Power, 2017; Shao et al., 2021); caspasa-1 en lesiones cerebrales y en PBMC (Shaw et al., 2011); así como caspasa-1 e IL18 en suero (Keane et al., 2018). Según la revisión de Barclay & Shinohara (2017) estos componentes inflamatorios se asocian con la enfermedad en varias etapas clave de su desarrollo, incluyendo la inflamación inicial, la polarización de células T, la disrupción de la BHE y la neurodegeneración. Todo ello contribuye a establecer el papel crítico y necesario del inflammasoma NLRP3 en el desarrollo de la enfermedad (Barclay & Shinohara, 2017).

En nuestra fase de validación, hemos encontrado una expresión diferencial de las isoformas codificantes IL1R1-205, IL1RN-205, NFκBIZ-206 y TNF-208, y de las no codificantes IL1B-205, IL1B-206, IL1B-207, IL1B-208, IL18-206 y NFκBIA-206 entre los pacientes con EM y los controles sanos, que podrían postularse como biomarcadores diagnósticos. Entre las diferentes formas clínicas, también se encontró una expresión diferencial de IL1B-207, IL1R1-205, NFκBIZ-206, NFκB2-203, IL1B-206, IL1B-208, IL18-206, y NFκBIZ-205, lo que resalta su potencial como biomarcadores de actividad de la enfermedad, ayudándonos a discriminar pacientes con diferentes formas clínicas.

La IL1β es una potente citoquina proinflamatoria producida por monocitos, células microgliales, astrocitos y células endoteliales cerebrales, que es clave en la fisiopatología de la EM, especialmente en las fases iniciales de la enfermedad (Dinarelli, 2018). Su

importancia radica, por un lado, en que es uno de los principales productos del inflammasoma NLRP3. Por otro, promueve la diferenciación de linfocitos T hacia fenotipos proinflamatorios, y favorece la ruptura de la BHE, facilitando así la infiltración de leucocitos activados en el SNC (Deng et al., 2019; Khan et al., 2023).

Adicionalmente, el receptor tipo 1 de la interleucina 1 (*IL1R1*) es el receptor funcional de IL1 α e IL1 β , así como del antagonista IL1RN. Tras unirse a la IL1, se asocia con el correceptor IL1RAP para formar el complejo receptor de alta afinidad, el cual media la activación de NF κ B, MAPK y otras vías de señalización, funcionando como un importante mediador de numerosas respuestas inflamatorias e inmunes inducidas por citoquinas. Por el contrario, la unión de este receptor IL1R1 al antagonista IL1RN impide la formación del complejo de señalización. La isoforma IL1R1-205 es el receptor funcional de membrana que participa activamente en la señalización proinflamatoria mediada por IL1.

El gen *NF κ B2* codifica la subunidad 2 del factor de transcripción NF κ B. Esta subunidad puede funcionar tanto como activador o represor transcripcional dependiendo de la molécula con la que se dimerice. Por su parte, el gen de un inhibidor de NF κ B (*NF κ BIA*) codifica una proteína que inhibe los complejos NF κ B/REL, implicados en las respuestas inflamatorias. A su vez, el gen *NF κ BIZ* codifica al inhibidor zeta de NF κ B y es un activador de la producción de IL6.

Por otra parte, si bien el TNF no forma parte directa de la vía clásica del inflammasoma, sí activa las vías de señalización del NF κ B, promoviendo la transcripción de IL1B e IL18. De hecho, se ha propuesto que desempeña un papel clave en el mantenimiento de la inflamación intratecal crónica, promoviendo el daño axonal y la neurodegeneración. Este proceso podría contribuir a la progresión de la EM y a la acumulación de discapacidad (Mazziotti et al., 2024).

Los resultados obtenidos en la fase de validación confirman la implicación de la vía del inflammasoma en la fisiopatología de la EM, especialmente en las formas de inicio en brotes. La sobreexpresión de isoformas como IL1R1-205, IL1RN-205, NF κ BIZ-206 y NF κ BIA-206 en EMRR sugiere una activación sostenida de mecanismos proinflamatorios mediados por IL1 y NF κ B y una mayor capacidad para responder a estas señales

inflamatorias agudas. La presencia de isoformas con retención de intrón también apunta a una regulación post-transcripcional alterada en esta vía.

En contraste, los pacientes con EMPP mostraron una sobre-expresión de las isoformas no codificadoras de proteína IL1 β -206, IL1 β -208 y IL18-206, lo que podría reflejar una menor activación inflamatoria, quizás más regulada, coherente con la progresión clínica de esta forma de EM. Las isoformas IL1 β -207, IL1 β -208 y TNF-208 destacan como marcadores diferenciales entre EMPP y las formas de inicio en brotes.

Estos resultados están en concordancia con los encontrados por Malhotra et al., 2020, quienes observaron niveles elevados de IL1B, TNF y NLRP3 en pacientes con EMPP en comparación con HC y con aquellos con inicio en brotes. Además, dicho grupo demostró mediante experimentos funcionales que el inflamasoma NLRP3 se encontraba hiperactivo en monocitos de pacientes con EMPP, lo que refuerza la implicación de esta vía en la fisiopatología de la enfermedad. En nuestro estudio también se observó una sobreexpresión de NLRP3-206 en pacientes con EMPP frente a HC y pacientes con inicio en brotes, aunque las diferencias no superaron la corrección por Bonferroni en las tres comparaciones. Además, la sobreexpresión de TNF-208 encontrada en pacientes con EMPP podría tener implicaciones funcionales más allá de la activación del inflamasoma, afectando directamente la evolución clínica de la enfermedad, ya que TNF- α puede inducir citotoxicidad directa sobre oligodendrocitos y neuronas, y aumentar la permeabilidad de la BHE. Esto facilita la entrada de células inmunes al SNC, exacerbando la pérdida axonal y la progresión de la discapacidad en esta forma clínica en la que predomina la neurodegeneración (Rossi et al., 2014).

La implicación funcional de la expresión diferencial de algunas isoformas de NF κ B y de sus inhibidores aún no está clara, dado que este factor participa en múltiples vías de señalización. No obstante, la sobreexpresión de NF κ B2-203 y de NF κ BIZ-206 en pacientes con EMRR podría estar modulando diversos procesos biológicos, incluyendo la inflamación, la respuesta inmune y la supervivencia celular.

Señalización de IL10, quimiocinas y moléculas de adhesión

Las quimiocinas participan en el desarrollo del sistema inmunológico y en las respuestas inflamatorias, tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa (Zlotnik & Yoshie, 2012). Además, las quimiocinas y moléculas de adhesión juegan un papel crucial en la patogenia de la EM facilitando la migración de las células T autorreactivas y los macrófagos al SNC (Sadeghian-Rizi et al., 2018). Por otra parte, ICAM1 es una molécula de adhesión expresada por células endoteliales, macrófagos y linfocitos, que desempeña un papel fundamental en la interacción entre leucocitos y endotelio, facilitando su adhesión y migración hacia el SNC, participando activamente en la activación leucocitaria y en diversas respuestas inmunitarias. También se ha reportado que hay una mayor expresión en células residentes en lesiones del SNC de pacientes con EM (García-Tortosa et al., 1998).

La expresión diferencial de isoformas como CCL3-204, CCL3L3-203, CXCL1-201 y CXCL2-202 refuerza la idea de que las alteraciones en la señalización de quimiocinas contribuyen a la heterogeneidad clínica de la EM. La infraexpresión de CCL3L3-203 en EMSP y EMPP y de CXCL2-202 en EMSP podría estar relacionada con una menor capacidad de reclutamiento celular desde la periferia en las formas progresivas. Por otro lado, la sobreexpresión de ICAM1-201 en EMRR sugiere un papel relevante en el aumento de la permeabilidad endotelial y la migración leucocitaria durante los brotes inflamatorios.

Además, la sobreexpresión de la isoforma no codificante CXCL3-204 en EMPP podría representar un mecanismo de regulación de los niveles de inflamación crónica y sostenida. La expresión diferencial de la isoforma no codificante CXCL2-203 también sugiere una regulación epigenética o post-transcripcional específica de cada forma clínica.

La isoforma no codificante ICAM1-203 estaba sobreexpresada únicamente en pacientes con EMRR y EMPP frente a aquellos con EMSP. Estudios en modelos de EAE han demostrado que combinaciones específicas de isoformas de ICAM1 contribuyen a distintos desenlaces clínicos. El procesamiento alternativo del ARN puede inducir modificaciones estructurales en la molécula de ICAM-1, que afectan sus interacciones con ligandos, modulando así la fuerza de adhesión, la señalización intracelular y, en consecuencia, la evolución de la enfermedad (Ramos et al., 2014).

En general, los resultados observados en el grupo de señalización de IL10 y moléculas de adhesión destacan la relevancia del procesamiento alternativo del ARN en la modulación de la respuesta inflamatoria y en la definición de los distintos fenotipos clínicos de la EM.

Isoformas no agrupadas en vías conocidas y análisis mediante curvas ROC

En el análisis transcriptómico detectamos varias isoformas con expresión diferencial que no podían agruparse en vías conocidas, entre ellas RPL15-210, ELAC1-201, PURA-201, PLAUR-214 y RNASEL-201.

RPL15 es una proteína ribosómica cuyo aumento de expresión se ha relacionado con progresión de diferentes tipos de neoplasias y con la enfermedad de Alzheimer (Suzuki et al., 2022).

ELAC1 (ribonucleasa Z 1) es una molécula implicada en el procesamiento del ARN, especialmente en el metabolismo del ARN de transferencia (tRNA). Se expresa en monocitos, neutrófilos, células NK y T, lo que sugiere un posible papel en la respuesta inmunitaria.

PURA (Purine-rich element-binding protein A) es una proteína altamente conservada con funciones clave en la regulación de la expresión génica y el mantenimiento de la homeostasis neuronal.

La proteína PLAUR (receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa) desempeña funciones clave en procesos celulares relacionados con la migración celular, la activación de monocitos y macrófagos, y la remodelación tisular. En el SNC, PLAUR se ha asociado con procesos de neuroinflamación, daño tisular y remodelación de la BHE.

La proteína RNASEL (ribonucleasa L) es una enzima intracelular con funciones críticas en la respuesta antiviral, la regulación del ARN y la inmunidad innata.

Las isoformas PURA-201, PLAUR-214 y RNASEL-201 mostraron patrones de expresión diferencial entre formas clínicas y controles, pero lo más destacable de este grupo es el aumento de expresión de PLAUR-214 y RNASEL-201 en los pacientes con formas EMPP frente a los controles y a otras formas clínicas, lo que indica que podrían estar implicadas en mecanismos patológicos aún no caracterizados.

El análisis ROC realizado en este estudio permitió identificar varias isoformas con capacidad discriminativa significativa entre pacientes con EM y controles sanos, lo que subraya su potencial como biomarcadores diagnósticos. Entre ellas, destacan IL1R1-205 y RNASEL-201, con AUC de 0,832 y 0,838 respectivamente, y valores de Youden elevados, lo que indica una buena capacidad para distinguir entre individuos con y sin EM. Estos resultados sugieren que estas isoformas podrían ser candidatas prometedoras en el desarrollo de herramientas diagnósticas moleculares para la EM. Aunque otras isoformas como NFKBIZ-206 y NFKBIA-206 también presentaron significación estadística, sus AUC fueron más moderadas y sus índices de Youden se mantuvieron por debajo de 0,5, lo cual limita su aplicabilidad diagnóstica de forma aislada.

Cabe destacar que en el análisis inverso (definiendo como estado predictivo el ser control sano), PURA-201 mostró una capacidad diagnóstica elevada (AUC = 0,820). Esto sugiere que su elevada expresión se asocia con la ausencia de EM, por lo que podría actuar como un biomarcador negativo, útil para contribuir a descartar la enfermedad en contextos clínicos.

Como ya se ha mencionado, IL1R1 es un receptor clave en la señalización inmunológica. Se une a las citoquinas proinflamatorias IL1 α e IL1 β , activando vías intracelulares que regulan la expresión de genes implicados en la inflamación, la fiebre, y la respuesta inmune innata. Además, también se expresa en SNC, donde participa en la modulación de circuitos neuronales relacionados con el estado de ánimo, la memoria y el procesamiento sensorial (Nemeth et al., 2024). En nuestro estudio se encuentra una sobreexpresión de la isoforma codificante IL1R1-205 en pacientes con EMRR frente a controles. Su alta capacidad para distinguir entre EM y HC (AUC = 0,832) respalda su utilidad como biomarcador potencial en el diagnóstico de la EM.

RNASEL, además de su función inmunológica en la respuesta antiviral ya mencionada, ha sido implicada en mecanismos de apoptosis y control de la inflamación (Chakrabarti et al., 2011). Algunos grupos habían encontrado una sobreexpresión de RNASEL en PBMC de pacientes con EMRR activa (Ferrandi et al., 2011). En el contexto de EM, donde la activación inmune y la neuroinflamación son procesos centrales, una alteración en la expresión de RNASEL-201 podría reflejar un intento del sistema inmune de limitar la

propagación de señales inflamatorias mediante la inducción de apoptosis en células activadas. Su elevada capacidad discriminativa apoya su potencial como biomarcador en el diagnóstico de EM.

Por otro lado, PURA es una proteína implicada en la regulación de la transcripción y la replicación del ADN y desempeña un papel esencial en el desarrollo y funcionamiento del SNC, vinculado con procesos como la plasticidad sináptica y la diferenciación neuronal (Daniel & Johnson, 2018). Estudios previos han vinculado deficiencias o disfunciones de PURA con diversas enfermedades neurológicas y neurodegenerativas (Hokkanen et al., 2012). Además, otros trabajos encuentran que su expresión puede ejercer un efecto neuroprotector (Molitor et al., 2021), lo que apoya su posible implicación en la fisiopatología de la EM. Nuestros resultados revelan que PURA-201 mostró un rendimiento diagnóstico elevado ($AUC = 0,820$) cuando se analizó como biomarcador negativo, lo que sugiere que su expresión disminuida en los pacientes con EMRR frente a controles podría reflejar una reducción de su efecto neuroprotector. Comprender con mayor profundidad las funciones moleculares de PURA y su implicación en enfermedades neurológicas podría abrir nuevas vías para la identificación temprana y el manejo de la EM.

Uno de los hallazgos más relevantes del presente trabajo fue la mejora significativa del **valor diagnóstico** al combinar las tres isoformas más prometedoras (**IL1R1-205, RNASEL-201 y PURA-201**). El modelo combinado obtuvo un AUC de 0,907 y un índice de Youden de 0,837, lo que indica una excelente capacidad discriminativa. Este rendimiento supera claramente al de cada isoforma por separado, subrayando el valor añadido de integrar múltiples marcadores en un único modelo diagnóstico.

Además del incremento en la capacidad predictiva, los modelos combinados presentan ventajas metodológicas y clínicas relevantes. Por un lado, permiten capturar de forma más precisa la complejidad biológica de enfermedades heterogéneas como la EM, al integrar distintos aspectos moleculares que pueden estar relacionados con mecanismos complementarios. Por otro, favorecen la robustez del diagnóstico frente a la variabilidad biológica de marcadores individuales, reduciendo así el riesgo de clasificaciones erróneas.

En conjunto, estos hallazgos respaldan el potencial diagnóstico de ciertas isoformas de ARN diferencialmente expresadas en EM y justifican su validación en futuras cohortes independientes.

Importancia de la estratificación de pacientes y aportes del análisis ROC multivariable en la determinación de la actividad de la enfermedad

Uno de los principales desafíos clínicos en la EM es la adecuada estratificación de pacientes según la forma clínica, es decir, la búsqueda de biomarcadores de actividad de la enfermedad que permitan distinguir entre las formas EMRR y la EMSP (Paul et al., 2019). Esta transición no solo implica un cambio en el curso clínico de la enfermedad, sino que suele marcar un punto de inflexión en la respuesta terapéutica y en la evolución funcional del paciente. Sin embargo, en la práctica clínica, esta distinción es a menudo retrospectiva (Inojosa et al., 2021) y subjetiva, debido a la falta de biomarcadores objetivos que permitan anticipar o confirmar el inicio de la progresión. Aunque se han propuesto distintos criterios, ninguno ha logrado consenso ni ha sido aceptado sobre los demás (Albelo-Martínez & Rizvi, 2025).

En este contexto, nuestros resultados aportan evidencia de que ciertos perfiles de expresión de ARN podrían contribuir a resolver esta necesidad. A través de un análisis ROC dirigido, se identificaron varias isoformas diferencialmente expresadas entre pacientes EMRR y EMSP, de las cuales cuatro (IL1R1-205, NFKB2-203, ELAC1-201 y PURA-201) mostraron capacidad discriminativa significativa, siendo la más importante IL1R1-205. Este resultado refleja una excelente capacidad para clasificar pacientes según su forma clínica de EM, lo que podría tener importantes implicaciones para la práctica médica, especialmente en escenarios donde la progresión no es clínicamente evidente.

Si bien estos resultados son alentadores, es necesario considerar que el modelo ha sido construido y evaluado dentro de una misma cohorte, lo que podría limitar su aplicabilidad general. La validación en cohortes independientes será fundamental para confirmar su utilidad clínica y evaluar su estabilidad ante la variabilidad biológica y técnica.

Expresión diferencial en pacientes con OIND

A pesar del reducido tamaño muestral del grupo OIND y de la limitación en el número de isoformas analizadas, los resultados obtenidos aportan información valiosa sobre los mecanismos moleculares comunes a los procesos neuroinflamatorios no específicos. Como era de esperar, la comparación con controles sanos permitió identificar un conjunto de isoformas sobreexpresadas en OIND que podrían estar implicadas en la fisiopatología general de la neuroinflamación, independientemente de su etiología.

La sobreexpresión de las isoformas no codificantes de IL1 β (206, 207 y 208), junto con la isoforma codificante NLRP3-206, en OIND frente a HC sugiere una activación robusta del inflammasoma. Este hallazgo es coherente con la naturaleza inflamatoria de estas enfermedades, y podría reflejar no solo una mayor actividad del inflammasoma, sino también una regulación post-transcripcional específica de IL1 β en este contexto. La presencia simultánea de TNF-208 refuerza esta hipótesis, ya que TNF- α es una citoquina clave en la amplificación de la respuesta inmune. Estas alteraciones estarían reflejando una activación sostenida de vías proinflamatorias en el SNC, compartida por distintas enfermedades neuroinflamatorias.

Asimismo, la sobreexpresión de quimiocinas como CXCL1-201 y CXCL3-204, junto con moléculas de adhesión como ICAM1-201, sugiere una alteración en la capacidad de reclutamiento y un aumento en la migración de células inmunes hacia el SNC. La expresión elevada de ELAC1-201 podría estar relacionada con la activación de vías de control de calidad del ARN en contextos inflamatorios.

Mientras que algunas de estas isoformas son codificantes (NLRP3-206, y CXCL1-201) y podrían reflejar una mayor actividad inflamatoria, la expresión de las no codificantes IL1 β -206, IL1 β -208 CXCL3-204 podría ofrecer una regulación postranscripcional, modulando la expresión génica para autolimitar el contexto inflamatorio de las OIND.

En conjunto, estos resultados destacan que el análisis combinado de isoformas codificantes y no codificantes permite identificar patrones de expresión específicos para las distintas formas clínicas de EM, así como para diferenciar EM de OIND. Esta aproximación puede facilitar el desarrollo de paneles de biomarcadores más precisos,

Discusión

útiles tanto para el diagnóstico como para el seguimiento clínico y la estratificación de los pacientes.

No obstante, algunas comparaciones deben interpretarse con cautela debido al tamaño reducido del grupo OIND, lo que puede haber condicionado ciertos resultados y limita su extrapolación. Esta limitación subraya la importancia de validar los hallazgos en cohortes independientes más amplias.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

6. CONCLUSIONES

1. Aunque no todas las proteínas inicialmente detectadas mediante análisis proteómico fueron validadas en la cohorte independiente, su identificación resultó fundamental para orientar la investigación hacia rutas biológicas relevantes y posibles mecanismos implicados en la progresión de la enfermedad.
2. La sobreexpresión de las enzimas PRDX6 y APEH en pacientes con EM, tanto en formas remitentes-recurrentes como progresivas, sugiere una implicación activa de estos mecanismos en la fisiopatología de la enfermedad. PRDX6, asociada a procesos de neuroprotección y reparación proteica, y APEH, implicada en la generación de péptidos acetilados proinflamatorios, se posicionan como biomarcadores prometedores para el diagnóstico y seguimiento clínico en EM, lo que justifica su validación en cohortes longitudinales más amplias.
3. La disminución de la expresión de MST1 en pacientes con EMRR, en comparación con formas progresivas y controles sanos, podría reflejar una alteración específica en la señalización inmunitaria durante las fases inflamatorias de la enfermedad, atenuando mecanismos neuroprotectores y favoreciendo la progresión de la enfermedad. Este hallazgo refuerza el potencial de MST1 como biomarcador de actividad de la enfermedad, especialmente útil para distinguir entre fases clínicas y orientar decisiones terapéuticas.
4. La asociación positiva entre los niveles séricos de APEH y MST1 con la gravedad de la enfermedad, así como de MST1 y PRDX6 con la discapacidad clínica, respalda su utilidad como biomarcadores pronósticos. Estos resultados sugieren que su monitorización podría contribuir a una estratificación más precisa de los pacientes y a la personalización de estrategias terapéuticas en EM.
5. Los mecanismos de procesamiento alternativo del ARN difieren entre pacientes con EM y controles, lo que da lugar a perfiles transcriptómicos distintivos, caracterizados por la alteración en la expresión de un elevado número de isoformas, que podrían reflejar alteraciones funcionales relevantes en la patogénesis de la enfermedad.

6. La firma transcriptómica distintiva observada en pacientes con la forma EMPP se caracterizó por la sobreexpresión de isoformas asociadas a las vías *“Reparación defectuosa por escisión de bases asociada con MUTYH”* y a *“Enfermedades de la reparación del ADN”*, mientras que en las formas de inicio en brotes predominaban las rutas de *“Señalización por interleucina 10”*, *“Señalización por la interleucina 1”* y *“Reclutamiento celular (respuesta inflamatoria)”*.
7. De las numerosas isoformas evaluadas en la fase de validación de transcritos, destacaron tres (IL1R1-205, RNASEL-201 y PURA-201) con capacidad discriminativa entre pacientes con EM y controles sanos mediante análisis ROC, lo que subraya su potencial como biomarcadores diagnósticos. La combinación de estas tres isoformas mejoró el rendimiento diagnóstico del modelo, evidenciado por un aumento tanto del área bajo la curva como del índice de Youden, lo que refleja una mejora en la sensibilidad y especificidad diagnóstica.
8. La isoforma IL1R1-205 se perfila como un biomarcador prometedor de actividad de la enfermedad, al mostrar una excelente capacidad discriminativa entre pacientes con formas EMRR, caracterizadas por una mayor implicación de procesos inflamatorios y de estrés oxidativo, y pacientes con formas EMSP, en las que predomina la neurodegeneración sobre la inflamación.
9. La mayoría de las isoformas analizadas se encontró sobreexpresada en pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OIND) en comparación con pacientes con EMRR. Cinco de estas isoformas (IL1 β -206, IL1 β -208, NLRP3-206, CXCL1-201 y CXCL3-204) mostraron un alto poder discriminativo entre ambos grupos, lo que resalta su potencial como biomarcadores para el diagnóstico diferencial. No obstante, estos hallazgos deben interpretarse con cautela debido al reducido tamaño muestral del grupo OIND.
10. Se identificó una expresión diferencial de numerosas isoformas de procesamiento alternativo no codificantes de proteína, cuyo papel funcional en la EM permanece escasamente explorado. Estos hallazgos subrayan la necesidad de estudios funcionales que evalúen su implicación en los procesos biológicos subyacentes a la enfermedad.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

7. SUMMARY

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system, characterized by inflammation, demyelination, and axonal loss occurring from the earliest stages of the disease. Each of these processes contributes to the patient's phenotype, resulting in a highly heterogeneous condition. Despite significant advances in treatment development in recent years, MS remains one of the most common causes of neurological disability in young adults.

The diagnosis of MS has evolved from a purely clinical approach to the integration of paraclinical tools. Originally, the diagnosis of MS was based solely on clinical observations. However, in 1983, new diagnostic criteria were introduced, which required evidence of at least two demyelinating lesions in the central nervous system (CNS) with dissemination in space (DIS) and time (DIT). The exclusion of other diseases presenting similar clinical symptoms was also necessary. The Poser criteria categorized MS patients based on various clinical and paraclinical tests, such as the number of relapses, evoked potentials, and the presence of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid (CSF). In 2001, McDonald and colleagues revised these criteria and made significant adjustments, including the incorporation of magnetic resonance imaging (MRI) into the diagnostic process. This allowed for the demonstration of dissemination in time and space without requiring multiple clinical episodes, as well as the use of oligoclonal bands in CSF as a marker of DIT. Subsequently, in 2010, the European MAGNIMS group presented a revision of the McDonald criteria, based on advances in neuroimaging.

Approximately 85–90% of patients present with a clinical course characterized by relapses (relapsing-remitting MS, RRMS). Around half of these patients will develop a progressive form (secondary progressive MS, SPMS) within 10 to 15 years. About 10–15% of patients present with a progressive form from onset (primary progressive MS, PPMS). This clinical evolution poses a major challenge: the need to distinguish early between RRMS and SPMS to optimize therapeutic management. This differentiation is particularly relevant in a context where treatments are more effective during inflammatory phases, and clinicians require tools to anticipate progression. Therefore,

the development of robust progression biomarkers applicable in clinical practice is urgently needed.

Despite diagnostic advances, there remains a need for sensitive and specific biomarkers that not only enable early detection of the disease but also characterize its clinical forms, predict progression, and monitor treatment response. In this context, fluid biomarkers, especially in blood, offer an accessible and minimally invasive alternative. Omics technologies, including proteomics and transcriptomics, address this need through a systematic discovery approach.

Alternative RNA splicing is a post-transcriptional mechanism that allows the generation of multiple isoforms from a single gene, conferring significant functional diversity to proteins. This phenomenon occurs in over 90% of human genes and is altered in various diseases, including MS. Its analysis can provide additional insights into genetic regulation across different disease phases, justifying its exploration as a source of biomarkers, particularly for capturing cellular functional states that escape conventional genetic analysis. Therefore, this thesis employed RNA-seq focused on alternative splicing isoforms to identify differential expression patterns related to diagnosis and progression.

Our hypothesis is that there are distinct molecular profiles, both proteomic and transcriptomic, in the peripheral blood of MS patients that enable the identification of biomarkers with diagnostic and prognostic value, as well as for monitoring disease activity. These biomarkers allow discrimination between MS patients, healthy controls (HC), and individuals with other inflammatory neurological diseases (OIND), as well as between the different clinical forms of MS.

The general objective is to identify and validate protein and gene expression biomarkers that enable:

- Differentiation of MS patients from HC and subjects with OIND.
- Detection of disease activity across its various clinical forms (RRMS, SPMS, and PPMS).

The specific objectives are:

1. Qualitative and quantitative characterization of the serum proteome through high-throughput proteomic analysis: Ultra-High Performance Liquid Chromatography and High-Resolution Mass Spectrometry (UHPLC-HRMS), to:
 - Select candidate proteins as diagnostic biomarkers to distinguish MS patients from HC.
 - Identify proteins associated with disease activity in the different clinical courses (RRMS, SPMS, and PPMS).
2. Validate the proteins with the highest discriminative power in an independent cohort using quantitative enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).
3. Analyze peripheral blood through high-throughput transcriptomic analysis (RNA-seq) to:
 - Select transcriptomic isoforms as candidate diagnostic biomarkers (MS vs. HC).
 - Detect isoforms associated with disease activity in the different clinical forms (RRMS, SPMS, and PPMS).
 - Select transcriptomic isoforms as candidate biomarkers for differential diagnosis (MS vs. OIND).
4. Validate the isoforms with the highest discriminative value in an independent cohort using real-time PCR (qPCR).

The biomarker discovery process was carried out in two key stages, involving untreated MS patients from the three clinical forms (RRMS, SPMS, and PPMS), HC, and patients with OIND:

1. Exploratory phase:
 - *Proteomics*: Analysis of soluble protein expression in serum (Sample size: 18 MS patients and 6 HC).
 - *Transcriptomics*: Analysis of gene expression of isoforms generated by alternative RNA splicing in PBMCs (Sample size: 19 MS patients, 7 HC, and 2 OIND).
2. Validation phase:
 - *Protein validation*: Soluble proteins with differential abundance in serum from the exploratory phase were re-evaluated using ELISA (Sample size: 80 MS patients and 21 HC).

- *Gene validation:* Gene expression of selected differentially expressed alternative RNA splicing isoforms from the exploratory phase was analyzed via qPCR (Sample size: 106 MS patients, 42 HC, and 7 OIND).

Analysis of Serum Proteins as Biomarkers

The proteomic analysis identified a total of 1,432 proteins, of which 393 met the criteria to be considered "Master" proteins within their respective protein groups, presented a false discovery rate (FDR) below 1%, and had at least two unique peptide sequences per protein. When comparing protein abundance between each clinical form and healthy controls, 13 proteins were found to be differentially abundant, specifically:

- RRMS vs. HC: Macrophage Stimulating Protein (MST1) and Complement Factor H-Related Protein 2 (CFHR2) showed more than double the abundance ratio (AR) in RRMS patients compared to controls. Conversely, Alpha-1B Glycoprotein (A1BG), Immunoglobulin Kappa Constant (IGKC), Immunoglobulin Kappa Light Chain, and Low-Affinity Immunoglobulin Gamma Fc Region Receptor III-A (FCGR3A) exhibited lower ARs in RRMS patients than in controls.
- SPMS vs. HC: SPMS patients showed lower ARs of FCGR3A, Immunoglobulin Kappa Light Chain, IGKC, and Alpha Actinin-1 (ACTN1) compared to controls.
- PPMS vs. HC: Proteins significantly increased in PPMS patients compared to HC included S100 Calcium-Binding Protein A6 (S100A6), Neutrophil Elastase (ELANE), Peroxiredoxin-6 (PRDX6), Phosphoglycerate Mutase 1 (PGAM1), and Bone Marrow Stromal Cell Antigen 1 (BST1). In contrast, Complement Factor H-Related Protein 5 (CFHR5) and FCGR3A were significantly lower in PPMS patients than in HC.

These proteins are involved in key biological pathways, particularly those related to innate immune system functions such as *Neutrophil degranulation*, *FCGR3A-mediated phagocytosis*, and *Regulation of the complement cascade*, reinforcing their potential diagnostic value. Moreover, two of these 13 proteins, along with two additional ones, showed significant differences between PPMS patients and those with relapse-onset forms.

Among the differentially abundant proteins between PPMS and RRMS patients, PGAM1 and Acylamino Acid-Releasing Enzyme (APEH) had higher ARs in the PPMS group, while Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) showed a higher AR in RRMS patients. Additionally, Neutrophil Elastase (ELANE) was more abundant in PPMS patients than in those with SPMS.

The differentially abundant proteins between PPMS and RRMS patients were associated with *Internalization and degradation of the very-low-density lipoprotein receptor (VLDLR)*, a key process in lipid metabolism regulation and cellular homeostasis in the CNS. On the other hand, proteins overabundant in PPMS compared to SPMS were involved in the *Pyroptosis* pathway, an inflammatory form of cell death mediated by caspases, and in the *Activation of matrix metalloproteinases*, both of which play fundamental roles in neuroinflammation and tissue damage in MS.

Of the 15 dysregulated proteins identified, 12 were evaluated in the validation phase using ELISA. Among these, six showed differential expression when analyzing all MS patients (regardless of clinical form) compared to HC. Specifically, BST1, PRDX6, and APEH were significantly elevated in MS patients. The ROC curves for these proteins in distinguishing MS from HC yielded the following areas under the curve (AUC) and confidence intervals (CI), with MS as the predictive condition: BST1 (AUC = 0.733, CI = 0.625–0.840; $p = 0.002$); PRDX6 (AUC = 0.720, CI = 0.599–0.841; $p = 0.002$), APEH (AUC = 0.712, CI = 0.599–0.826; $p = 0.004$). These values indicate an acceptable predictive power. Conversely, CFHR5, MST1, and CFHR2 levels were significantly lower in MS patients compared to healthy controls. The AUC values for these proteins, with the predictive condition being absence of MS, were: CFHR5 (AUC = 0.792, CI = 0.655–0.929; $p = 0.001$), MST1 (AUC = 0.700, CI = 0.552–0.848; $p = 0.006$), CFHR2 (AUC = 0.650, CI = 0.528–0.772; $p = 0.04$).

The Kruskal-Wallis test revealed differential enrichment of PRDX6 ($p = 0.002$), FCGR3A ($p = 0.039$), APEH ($p = 0.009$), CFHR5 ($p = 0.002$), BST1 ($p = 0.002$), and MST1 ($p = 0.0002$) among the groups (MS patients with relapse-onset forms [RRMS and SPMS], PPMS, and HC). Network analysis using Reactome indicated that proteins with elevated abundance in MS patients were enriched in pathways related to cellular stress response (e.g., Response to chemical stress and detoxification of reactive oxygen

species), the immune system (e.g., *Innate immune response*, *Neutrophil degranulation*, and *Regulation of the complement cascade*), and protein metabolism (e.g., *Synthesis of GPI-anchored proteins*). On the other hand, proteins with decreased abundance in MS samples were enriched in signal transduction pathways, such as *MST1 signaling* and *Hippo signaling*.

Linear regression analysis between serum protein levels and disease disability measures (based on the Expanded Disability Status Scale, EDSS) in MS cases, adjusted for sex and age, revealed positive associations, after correction for multiple comparisons, for MST1 and PRDX6. Additionally, MST1 and APEH were significantly associated with MS severity, as measured by the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS).

Peroxiredoxin 6 (PRDX6) is an enzyme known for its antioxidant properties. In our study, significantly elevated serum levels of PRDX6 were observed in patients across all clinical forms of MS compared to HC, with particularly marked increases in PPMS patients. These findings may represent a compensatory response to the neurodegenerative and oxidative processes characteristic of MS. The significant association between PRDX6 levels and disease progression, as assessed by the EDSS scale, reinforces its potential as a prognostic biomarker and a possible therapeutic target to reduce inflammation and oxidative damage in MS.

Acylpeptidase (APEH) is another protein found to be elevated across all clinical forms of MS. Although no previous studies have established a direct link between this protein and MS, the association between its serum levels and MSSS scores suggests a potential role in disease pathophysiology, particularly in progressive phases. APEH is an enzyme that degrades bacterial and mitochondrial proteins via hydrolysis, releasing acetylated peptides with chemoattractant properties for phagocytes, which may induce inflammation. It has been proposed that lipid peroxidation products generated during inflammatory processes can bind to APEH and inhibit its activity. Further research is needed to determine whether elevated serum levels of APEH reflect an inflammatory response triggered by acetylated peptides, or a functional inhibition by lipid peroxidation products that promotes redox imbalance and disease progression.

Serum levels of Macrophage Stimulating Protein (MST1) were significantly lower in RRMS patients compared to HC and other MS clinical forms. MST1 is known to modulate the innate immune system, regulate naïve T cell proliferation, and protect against oxidative stress. While it is not possible to determine whether the marked decrease in MST1 serum levels observed in RRMS patients directly contributes to immune dysfunction, it may favor an imbalance in regulatory T cells, promoting a pro-inflammatory T cell phenotype that exacerbates neuroinflammation.

This study identified a set of serum proteins with significant alterations in MS patients, many of which are involved in key processes such as inflammation, oxidative stress, immune regulation, complement activation, and blood-brain barrier dysfunction. These findings not only reinforce the central role of these pathways in MS pathophysiology but also highlight the potential of these proteins as serum biomarkers for phenotypic characterization and clinical monitoring of the disease.

Analysis of Alternative RNA Splicing Isoforms in PBMCs as Biomarkers

Transcriptomic analysis via RNA-seq of PBMCs from MS patients and HC identified 59,128 isoforms generated through alternative RNA splicing. Specifically, when comparing global gene expression across all MS patients (including the three clinical forms) with HC, 1,344 differentially expressed isoforms were identified (395 downregulated and 949 upregulated), corresponding to 993 distinct genes.

When gene expression of alternative splicing isoforms was analyzed by clinical form compared to HC, RRMS patients showed 1,182 differentially expressed variants (DEVs), SPMS patients showed 7776, and PPMS patients showed 48.

In the comparison between RRMS and HC, the most differentially expressed RNA isoforms clustered in functional pathways associated with cytokine and interferon signaling, as well as multiple inflammatory pathways, including interleukin-mediated signaling (IL1, IL4, IL6, IL10) and both canonical and non-canonical NFκB pathways. This profile suggests an active inflammatory state with strong involvement of the adaptive immune system, characteristic of early MS stages.

In the comparison between SPMS and HC, the most differentially expressed RNA isoforms clustered in chronic inflammatory activation pathways, such as *TNF*

signaling and *Innate immune system* involvement. Additionally, these variants were grouped in *DNA repair pathways*, suggesting a more deteriorated cellular environment under sustained stress.

Finally, the most differentially expressed RNA isoforms in PPMS patients compared to HC did not cluster around immune or inflammatory pathways, but rather around those associated with *Defective base excision repair involving MUTYH* and *Base excision repair-related diseases*, which are implicated in the response to oxidative damage.

Taken together, these findings reinforce the notion of distinct alternative RNA splicing isoform profiles underlying the pathogenesis of different MS clinical forms. In RRMS, isoforms associated with inflammatory pathways predominate; in SPMS, there is a prevalence of isoforms linked to both inflammation and neurodegenerative processes; and in PPMS, isoforms related to cellular damage and repair mechanisms dominate, suggesting an advanced phase of tissue dysfunction.

Given the high number of differentially expressed alternative splicing isoforms identified in the exploratory phase, a representative subset was selected for validation via qPCR. Specifically, isoforms linked to pathways such as IL1 processing, particularly those related to the NLRP3 inflammasome signaling, as well as the IL10 signaling pathway were included, as these showed the highest enrichment in the comparison between MS patients and HC. Additionally, cytokines, adhesion molecules, and other differentially expressed isoforms from various comparisons between MS patients and HC were also validated.

The validation results confirmed the involvement of the inflammasome pathway in MS pathophysiology, particularly in relapse-onset forms. Overexpression of isoforms such as IL1R1-205, IL1RN-205, NFKBIZ-206, and NFKBIA-206 in RRMS suggests sustained activation of pro-inflammatory mechanisms mediated by IL1 and NF κ B, and a heightened capacity to respond to acute inflammatory signals. The presence of intron-retaining isoforms also points to altered post-transcriptional regulation in this pathway.

In contrast, PPMS patients showed overexpression of non-protein-coding isoforms such as IL1 β -206, IL1 β -208, and IL18-206, which may reflect a more regulated, less active inflammatory response, consistent with the clinical progression of this MS form.

Isoforms IL1 β -207, IL1 β -208, and TNF-208 stand out as differential markers between PPMS and relapse-onset forms.

Differential expression of isoforms such as CCL3-204, CCL3L3-203, CXCL1-201, and CXCL2-202 reinforces the idea that chemokine signaling alterations contribute to MS clinical heterogeneity. Downregulation of CCL3L3-203 in SPMS and PPMS, and of CXCL2-202 in SPMS, may be related to reduced cellular recruitment capacity from the periphery in progressive forms. Conversely, ICAM1-201 overexpression in RRMS suggests a key role in endothelial permeability and leukocyte migration during inflammatory relapses.

Overall, the results observed in the IL10 signaling and adhesion molecule groups highlight the relevance of alternative RNA splicing in modulating the inflammatory response and defining the distinct clinical phenotypes of MS.

Finally, isoforms of PURA-201 (Purine Rich Element Binding Protein A), PLAUR-214 (Plasminogen Activator, Urokinase Receptor), and RNASEL-201 (Ribonuclease L) showed differential expression patterns between clinical forms and controls. Most notably, PLAUR-214 and RNASEL-201 were upregulated in PPMS patients compared to both controls and other clinical forms, suggesting potential involvement in yet uncharacterized pathological mechanisms.

The ROC analysis conducted in this study enabled the identification of several isoforms with significant discriminative capacity between MS patients and HC. Specifically, the combined model of isoforms IL1R1-205, RNASEL-201, and PURA-201 achieved an AUC of 0.907 and a Youden index of 0.837, indicating excellent discriminative ability. This performance clearly surpasses that of each isoform individually, highlighting the added value of integrating multiple markers into a single diagnostic model.

These findings support the diagnostic potential of certain differentially expressed RNA isoforms in MS and justify their validation in future independent cohorts. Furthermore, they reinforce the utility of ROC analysis in multivariable models, and emphasize the value of integrating multiple molecular markers to improve diagnosis in diseases with heterogeneous clinical courses such as MS.

Summary

One of the main clinical challenges in MS is the search for biomarkers of disease activity that can distinguish between RRMS and SPMS. In this context, our results provide evidence that certain RNA expression profiles may help address this need. Through targeted ROC analysis, four alternative splicing isoforms were identified with significant discriminative capacity between the two clinical forms, with IL1R1-205 being the most prominent. This result reflects an excellent ability to classify patients according to their MS clinical form, which could have important implications for medical practice, especially in scenarios where progression is not clinically evident.

The comparison between OIND and RRMS allowed the identification of a subset of isoforms that may have value in differential diagnosis. In particular, five alternative splicing isoforms involved in the inflammasome pathway and two chemokines, were found to be significantly overexpressed in patients with OIND compared to those with RRMS.

In conclusion, this work has identified and validated a set of serum proteins and alternative RNA splicing isoforms capable of distinguishing not only between MS patients and HC, but also between different clinical forms of the disease. These findings provide potential tools to advance toward more personalized medicine in MS, enabling improved diagnosis, patient stratification, and clinical monitoring through accessible and non-invasive biomarkers. The integration of proteomic and transcriptomic data has proven to be an effective approach to capture the complexity of MS and opens new avenues for the development of clinical tools based on molecular biomarkers.

CONCLUSIONS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

8. CONCLUSIONS

1. Although not all proteins initially detected via proteomics were validated in the independent cohort, their identification turned out to be fundamental to guide research towards relevant biological pathways and possible mechanisms involved in disease progression.
2. The overexpression of the enzymes PRDX6 and APEH in MS patients, both in relapsing-remitting and progressive forms, suggests an active involvement of these mechanisms in the pathophysiology of the disease. PRDX6, associated with neuroprotection and protein repair processes, and APEH, implicated in the generation of pro-inflammatory acetylated peptides, emerge as promising biomarkers for diagnosis and clinical monitoring in MS, justifying their validation in larger longitudinal cohorts.
3. The decreased expression of MST1 in patients with RRMS, compared to progressive forms and healthy controls, may reflect a specific alteration in immune signaling during the inflammatory phases of the disease, dampening neuroprotective mechanisms and favoring disease progression. This finding reinforces the potential of MST1 as a disease activity biomarker, particularly useful for distinguishing between clinical phases and guiding therapeutic decisions.
4. The positive association between serum levels of APEH and MST1 with disease severity, as well as MST1 and PRDX6 with clinical disability, supports their utility as prognostic biomarkers. These results suggest that monitoring them could contribute to a more precise stratification of patients and to the personalization of therapeutic strategies in MS.
5. Alternative RNA splicing mechanisms differ between MS patients and controls, resulting in distinct transcriptomic profiles, characterized by altered expression of a large number of isoforms, which could reflect relevant functional changes in the pathogenesis of the disease.

6. The distinctive transcriptomic signature observed in PPMS patients was characterized by the overexpression of isoforms associated with the pathways *“Defective base excision repair associated with MUTYH”* and *“DNA repair diseases”*, whereas in relapse-onset forms, the predominant pathways were *“Interleukin-10 signaling”*, *“Interleukin-1 signaling”*, and *“Cell recruitment (inflammatory response)”*.
7. Among the numerous isoforms evaluated in the transcript validation phase, three (IL1R1-205, RNASEL-201, and PURA-201) stood out for their discriminatory capacity between MS patients and healthy controls via ROC analysis, underscoring their potential as diagnostic biomarkers. The combination of these three isoforms improved the diagnostic performance of the model, as evidenced by an increase in both the area under the curve and the Youden index, reflecting an improvement in diagnostic sensitivity and specificity.
8. The IL1R1-205 isoform stands out as a promising biomarker of disease activity, showing excellent discriminatory capacity between patients with RRMS, characterized by greater involvement of inflammatory and oxidative stress processes, and patients with SPMS, in which neurodegeneration predominates over inflammation.
9. Most of the analyzed isoforms were found to be overexpressed in patients with OIND compared to RRMS patients. Five of these isoforms (IL1 β -206, IL1 β -208, NLRP3-206, CXCL1-201, and CXCL3-204) demonstrated high discriminatory power between the two groups, highlighting their potential as biomarkers for differential diagnosis. However, these findings should be interpreted with caution due to the small sample size of the OIND group.
10. Differential expression was identified in numerous non-protein-coding isoforms resulting from alternative splicing, whose functional role in MS remains scarcely explored. These findings underscore the need for functional studies to evaluate their involvement in the biological processes underlying the disease.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

9. ANEXO I

Tabla suplementaria 1. Concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar en la determinación de las proteínas

Proteína	Concentraciones de los diferentes puntos de la curva estándar
ACTN1:	20 ng/mL , 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL, 0.3125 ng/mL, 0 ng/mL
APEH:	10 ng/mL , 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL, 0.3125 ng/mL, 0.156 ng/mL, 0 ng/mL
BST1:	10 ng/mL , 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL, 0.3125 ng/mL, 0.156 ng/mL, 0 ng/mL
CFHR2:	20 ng/mL , 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL, 0.3125 ng/mL, 0 ng/mL
CFHR5:	2000 pg/mL , 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.2 pg/mL, 0 pg/mL
ELANE:	20 ng/mL , 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL, 0.3125 ng/mL, 0 ng/mL
FCGR3A:	2000 pg/mL , 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.2 pg/mL, 0 pg/mL
MST1:	10000 pg/mL , 5000 pg/mL, 2500 pg/mL, 1250 pg/mL, 625 pg/mL, 312 pg/mL, 156 pg/mL, 0 pg/mL
PCSK9:	40 ng/mL , 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL, 0 ng/mL
PGAM1:	20 ng/mL , 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL, 0.3125 ng/mL, 0 ng/mL
PRDX6:	1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.25 pg/mL, 15.625 pg/mL, 0 pg/mL
S100A6:	5000 pg/mL , 2500 pg/mL, 1250 pg/mL, 625 pg/mL, 312 pg/mL, 156 pg/mL, 78 pg/mL, 0 pg/mL

10. ANEXO II

Tabla suplementaria 2. Rutas Reactome de la comparación EM con HC. Clúster 1. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 1**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EM y sujetos control**.

Ruta <i>Reactome</i>	Genes asociados encontrados	p _{adj} .*
Traducción	[EEF1A1, EIF2S1, EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, MRPL13, MRPL15, MRPL16, MRPL20, MRPL24, MRPL4, MRPS11, MRPS14, MRPS15, RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	3,20E-41
Silenciamiento traduccional mediado por L13a de la expresión de ceruloplasmina	[EIF2S1, EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	2,39E-32
Hidrólisis de GTP y unión de la subunidad ribosomal 60S	[EIF2S1, EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	2,87E-32
Inicio de la traducción eucariota	[EIF2S1, EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	1,20E-31
Inicio de la traducción dependiente de cap	[EIF2S1, EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	1,20E-31
Formación de un conjunto de subunidades 40S libres	[EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	3,06E-31
Formación del complejo ternario y posteriormente del complejo 43S	[EIF2S1, EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	1,69E-26
Elongación de la cadena peptídica	[EEF1A1, RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	3,54E-26

Elongación de la traducción eucariota	[EEF1A1, RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	8,11E-26
Formación del complejo de iniciación de la traducción	[EIF2S1, EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	1,66E-25
Escaneo ribosomal y reconocimiento del codón de inicio	[EIF2S1, EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	1,66E-25
Activación del ARNm tras la unión del complejo de unión al cap y los eIFs, y posterior unión al 43S	[EIF2S1, EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	2,18E-25
Respuesta de EIF2AK4 (GCN2) a la deficiencia de aminoácidos	[EIF2S1, RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	3,62E-25
Traducción de ARNm viral	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	3,11E-24
Síntesis de selenocisteína	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	6,69E-24
Terminación de la traducción eucariota	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	6,69E-24
Degradación mediada por codones sin sentido (NMD) independiente del complejo de unión a exones (EJC)	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	9,43E-24
Dirección cotraduccional de proteínas dependiente de SRP hacia la membrana	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	1,81E-22
Degradación mediada por codones sin sentido (NMD)	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	2,76E-22
Degradación mediada por codones sin sentido (NMD) aumentada por el complejo de unión a exones (EJC)	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	2,76E-22

Anexo II

Metabolismo de selenoaminoácidos	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	4,15E-22
Respuesta celular a la inanición	[EIF2S1, RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	1,01E-21
Transcripción y replicación del ARN viral de influenza	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	4,08E-21
Regulación de la expresión de SLITs y ROBOs	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7, UBC]	4,91E-21
Infección por influenza	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	4,57E-20
Señalización por receptores ROBO	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7, UBC]	3,70E-19
Vía principal del procesamiento de rRNA en el nucleolo y el citosol	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	6,93E-19
Procesamiento de rRNA en el núcleo y el citosol	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	1,58E-18
Procesamiento de rRNA	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	3,39E-18
SARS-CoV-2 modula la maquinaria de traducción del hospedador	[RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	1,83E-16
Metabolismo de aminoácidos y derivados	[RPL17, RPL21, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL9, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7]	7,39E-14
Interacciones entre SARS-CoV-2 y el hospedador	[NLRP3, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7, UBC]	2,01E-12
Inicio de la traducción mitocondrial	[MRPL13, MRPL15, MRPL16, MRPL20, MRPL24, MRPL4, MRPS11, MRPS14, MRPS15]	1,26E-10
Elongación de la traducción mitocondrial	[MRPL13, MRPL15, MRPL16, MRPL20, MRPL24, MRPL4, MRPS11, MRPS14, MRPS15]	1,26E-10

Terminación de la traducción mitocondrial	[MRPL13, MRPL15, MRPL16, MRPL20, MRPL24, MRPL4, MRPS11, MRPS14, MRPS15]	1,26E-10
Infección por SARS-CoV-2	[NLRP3, RPS11, RPS15A, RPS18, RPS20, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27L, RPS29, RPS3A, RPS7, UBC]	1,34E-10
Traducción mitocondrial	[MRPL13, MRPL15, MRPL16, MRPL20, MRPL24, MRPL4, MRPS11, MRPS14, MRPS15]	1,74E-10
Señalización por interferón alfa/beta	[IRF1, OASL, SOCS3]	2,65E-03
Necrosis regulada	[IL18, IRF1, UBC]	2,71E-03

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 3. Rutas Reactome de la comparación EM con HC. Clúster 2. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 2**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EM y sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	p _{adj.} *
Señalización por interleucinas	[CASP1, CCL4, CSF1, CXCL1, HIF1A, HMOX1, ICAM1, IL10RA, IL1B, IL1RN, ITGAX, JUN, MAPK8, MMP9, MYC, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, PTGS2, STAT1, TNF, TP53]	2,40E-15
Señalización de interleucina-10	[CCL4, CSF1, CXCL1, ICAM1, IL10RA, IL1B, IL1RN, PTGS2, TNF]	3,85E-11
Señalización de interleucina-4 e interleucina-13	[HIF1A, HMOX1, ICAM1, IL1B, ITGAX, MMP9, MYC, PTGS2, STAT1, TNF, TP53]	1,24E-10
Inicio de la traducción mitocondrial	[MRPL33, MRPL35, MRPL38, MRPL51, MRPS18C, MRPS28, MRPS33, MTIF3]	3,26E-07
Traducción mitocondrial	[MRPL33, MRPL35, MRPL38, MRPL51, MRPS18C, MRPS28, MRPS33, MTIF3]	5,42E-07
Procesamiento de interleucina-1	[CASP1, IL1B, NFKB1, NFKB2]	2,42E-06
Señalización purinérgica en la infección por leishmaniasis	[CASP1, HMOX1, IL1B, NFKB1, NFKB2]	5,23E-06
Reclutamiento celular (respuesta proinflamatoria)	[CASP1, HMOX1, IL1B, NFKB1, NFKB2]	5,23E-06
Elongación de la traducción mitocondrial	[MRPL33, MRPL35, MRPL38, MRPL51, MRPS18C, MRPS28, MRPS33]	6,92E-06
Terminación de la traducción mitocondrial	[MRPL33, MRPL35, MRPL38, MRPL51, MRPS18C, MRPS28, MRPS33]	6,92E-06
Necrosis regulada	[CASP1, CASP8, CFLAR, CYCS, IL1B, TP53]	1,08E-05

Anexo II

El inflamasoma NLRP3	[CASP1, HMOX1, NFKB1, NFKB2]	3,06E-05
Vía CLEC7A/inflamasoma	[CASP8, IL1B, NFKB1]	7,34E-05
Inflamasomas	[CASP1, HMOX1, NFKB1, NFKB2]	9,31E-05
La variante de IkBA conduce a EDA-ID	[NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,21E-04
Señalización de la familia de interleucina-1	[CASP1, IL1B, IL1RN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,53E-04
Cascada del receptor tipo Toll 3 (TLR3)	[CASP8, JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,76E-04
Cascada de TLR4 independiente de MyD88	[CASP8, JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	2,21E-04
Señalización de TLR4 mediada por TRIF (TICAM1)	[CASP8, JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	2,21E-04
Vías de señalización de receptores NLR (dominio de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina)	[CASP1, CASP8, HMOX1, NFKB1, NFKB2]	2,26E-04
Piroptosis	[CASP1, CYCS, IL1B, TP53]	2,54E-04
Inducción de interferón alfa/beta mediada por DDX58/IFIH1	[ATG5, CASP8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,16E-03
Cascada del receptor tipo Toll 4 (TLR4)	[CASP8, JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,21E-03
Cascada del receptor tipo Toll 10 (TLR10)	[JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,32E-03
Cascada del receptor tipo Toll 5 (TLR5)	[JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,32E-03
Cascada dependiente de MyD88 iniciada en la membrana plasmática	[JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,32E-03
Señalización por receptores de muerte (Death Receptor)	[CASP8, CFLAR, MAPK8, NFKB1, NFKBIA, TNF]	1,36E-03
Activación de NFkB mediada por RIP a través de ZBP1	[NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,56E-03
Inducción mediada por TRAF6 de NFkB y quinasas MAP tras activación de TLR7/8 o 9	[JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,61E-03
Cascada dependiente de MyD88 iniciada en el endosoma	[JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,61E-03
Cascada del receptor tipo Toll 7/8 (TLR7/8)	[JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,61E-03
Cascada del receptor tipo Toll 9 (TLR9)	[JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,78E-03
Cascada del receptor tipo Toll TLR1:TLR2	[JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,88E-03
Cascada del receptor tipo Toll 2 (TLR2)	[JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	1,88E-03

Vía intrínseca de apoptosis	[CASP8, CYCS, MAPK8, TP53]	1,99E-03
Señalización de interleucina-1	[IL1B, IL1RN, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	2,07E-03
Cascada MyD88:MAL (TIRAP) iniciada en la membrana plasmática	[JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	2,14E-03
Cascada del receptor tipo Toll TLR6:TLR2	[JUN, MAPK8, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	2,14E-03
Señalización de CLEC7A (Dectin-1)	[CASP8, IL1B, NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	2,14E-03
Inducción de IFN tipo I mediada por ZBP1 (DAI)	[NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	2,18E-03
Activación de NF-kB mediada por TRAF6	[NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	2,79E-03
Senescencia inducida por estrés oxidativo	[H3-3B, JUN, KDM6B, MAPK8, TP53]	3,75E-03
Enfermedades del sistema inmunitario	[NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	4,45E-03
Enfermedades asociadas a la cascada de señalización TLR	[NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	4,45E-03
Activación de IKK y NF-kappa-B dependiente de TAK1	[NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	4,83E-03
Regulación de la señalización de TNFR1	[CASP8, CFLAR, TNF]	5,12E-03
Señalización de interferón alfa/beta	[EGR1, IRF8, STAT1]	5,13E-03
Señalización de interleucina-17	[JUN, MAPK8, NFKB1]	5,13E-03
Interacciones de integrinas en la superficie celular	[CD44, ICAM1, ITGAX, THBS1]	5,31E-03
Señalización de interferón gamma	[CD44, ICAM1, IRF8, STAT1]	5,88E-03
Señalización de TNF	[CASP8, CFLAR, TNF]	6,27E-03
Citoprotección por HMOX1	[CYCS, HMOX1, NFE2L2]	7,37E-03
Activación de quinasas MAP	[JUN, MAPK8, NFKB1]	7,37E-03
Sensores citosólicos de ADN asociado a patógenos	[NFKB1, NFKB2, NFKBIA]	7,37E-03
Regulación de la transcripción del gen PTEN	[EGR1, JUN, TP53]	9,65E-03

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 4. Rutas Reactome de la comparación EM con HC. Clúster 3. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 3**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EM y sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	P _{adj.} *
Transporte electrónico respiratorio, síntesis de ATP por acoplamiento quimiosmótico y producción de calor por proteínas desacopladoras	[ATP5MF, ATP5PB, COX5B, COX7B, NDUFA13, NDUFA5, NDUFB1, NDUFB3, NDUFB4, NDUFS2, NDUFS4, UQCRC1]	2,72E-12
El ciclo del ácido cítrico (TCA) y el transporte electrónico respiratorio	[ATP5MF, ATP5PB, COX5B, COX7B, NDUFA13, NDUFA5, NDUFB1, NDUFB3, NDUFB4, NDUFS2, NDUFS4, UQCRC1]	1,52E-10
Transporte electrónico respiratorio	[COX5B, COX7B, NDUFA13, NDUFA5, NDUFB1, NDUFB3, NDUFB4, NDUFS2, NDUFS4, UQCRC1]	2,73E-10
Biogénesis del Complejo I	[NDUFA13, NDUFA5, NDUFB1, NDUFB3, NDUFB4, NDUFS2, NDUFS4]	7,77E-08
Fosforilación del APC/C	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDK1, UBE2E1]	3,51E-07
Degradación de la ciclina B mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDK1, UBE2E1]	9,07E-07
Regulación aberrante del ciclo celular mitótico debido a defectos en RB1	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDKN1A, UBE2E1]	7,38E-06
Enfermedades del ciclo celular mitótico	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDKN1A, UBE2E1]	9,28E-06
Degradación de la ciclina A mediada por Cdc20:APC/C fosforilado	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDK1, PSMA5, UBE2E1]	1,01E-05
Degradación de proteínas del ciclo celular mediada por APC:Cdc20 antes de la satisfacción del punto de control del ciclo celular	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDK1, PSMA5, UBE2E1]	1,03E-05
Degradación de proteínas mitóticas mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDK1, PSMA5, UBE2E1]	1,14E-05
Activación del APC/C y degradación de proteínas mitóticas mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDK1, PSMA5, UBE2E1]	1,16E-05
Regulación de los activadores del APC/C entre G1/S y la anafase temprana	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDK1, PSMA5, UBE2E1]	1,46E-05
Conversión de APC/C:Cdc20 a APC/C:Cdh1 en la anafase tardía	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, UBE2E1]	1,68E-05
Regulación aberrante de la salida mitótica en cáncer debido a defectos en RB1	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, UBE2E1]	1,68E-05
Degradación de proteínas del ciclo celular mediada por APC/C	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDK1, PSMA5, UBE2E1]	1,87E-05
Regulación del ciclo celular mitótico	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDK1, PSMA5, UBE2E1]	1,87E-05

Inhibición de la actividad proteolítica de APC/C requerida para el inicio de la anafase por componentes del punto de control del huso mitótico	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, UBE2E1]	1,90E-05
Inactivación de APC/C mediante inhibición directa del complejo APC/C	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, UBE2E1]	1,90E-05
Degradación de Nek2A mediada por APC-Cdc20	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, UBE2E1]	3,90E-05
Autodegradación de Cdh1 por Cdh1:APC/C	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, PSMA5, UBE2E1]	6,15E-05
Degradación de Securina mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, PSMA5, UBE2E1]	7,38E-05
Degradación de Cdc20 y otras proteínas objetivo de APC/C:Cdh1 mediada por APC/C:Cdh1 en mitosis tardía/G1 temprana	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, PSMA5, UBE2E1]	8,39E-05
Fosforilación y eliminación de Cdc6 mediada por CDK	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, PSMA5, UBE2E1]	9,16E-05
Regulación transcripcional por VENTX	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, UBE2E1]	1,03E-04
Cambio de los orígenes a un estado post-replicativo	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, PSMA5, UBE2E1]	1,61E-04
Síntesis de ADN	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, PSMA5, UBE2E1]	2,98E-04
Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)	[ANAPC10, ANAPC15, ANAPC16, CDKN1A, UBE2E1]	3,10E-04
Biogénesis mitocondrial	[ATP5MF, ATP5PB, CALM3, SSBP1]	6,72E-04

* p_{adj} . significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 5. Rutas Reactome de la comparación EM con HC. Clúster 4. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 4**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EM y sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	p_{adj} . *
Inicio de la transcripción del VIH	[GTF2A1, GTF2H3, GTF2H5, TAF11]	4,24E-08
Escape del promotor del VIH por la ARN polimerasa II	[GTF2A1, GTF2H3, GTF2H5, TAF11]	4,24E-08
Escape del promotor por la ARN polimerasa II	[GTF2A1, GTF2H3, GTF2H5, TAF11]	4,24E-08

Anexo II

Preiniciación de la transcripción por ARN polimerasa II y apertura del promotor	[GTF2A1, GTF2H3, GTF2H5, TAF11]	4,24E-08
Inicio de la transcripción por ARN polimerasa II	[GTF2A1, GTF2H3, GTF2H5, TAF11]	4,24E-08
Inicio de la transcripción y liberación del promotor por ARN polimerasa II	[GTF2A1, GTF2H3, GTF2H5, TAF11]	4,24E-08
Transcripción del genoma del VIH	[GTF2A1, GTF2H3, GTF2H5, TAF11]	1,62E-07
Eventos de pretranscripción de la ARN polimerasa II	[GTF2A1, GTF2H3, GTF2H5, TAF11]	1,96E-07
La ARN polimerasa II transcribe genes de snRNA	[GTF2A1, TAF11, TAF8]	1,04E-05

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 6. Rutas Reactome de la comparación EM con HC. Clúster 5. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 5**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EM y sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	p _{adj.} *
Empalme de mRNA - Vía principal	[HNRNPA3, HNRNPD, HNRNPM, PUF60, RNPS1, SF3A1, SF3B2, SNRPA1, SRSF3]	1,24E-10
Empalme de mRNA	[HNRNPA3, HNRNPD, HNRNPM, PUF60, RNPS1, SF3A1, SF3B2, SNRPA1, SRSF3]	1,24E-10
Procesamiento de pre-mRNA con intrones y cap	[CHTOP, HNRNPA3, HNRNPD, HNRNPM, PUF60, RNPS1, SF3A1, SF3B2, SNRPA1, SRSF3]	1,24E-10
Respuesta celular a la hipoxia	[PSMB3, PSMB6, UBE2D1]	8,02E-07
Hidroxilación de prolina dependiente de oxígeno del factor inducible por hipoxia alfa (HIF-α)	[PSMB3, PSMB6, UBE2D1]	8,02E-07
Autodegradación de Cdh1 por Cdh1:APC/C	[PSMB3, PSMB6, UBE2D1]	8,02E-07
Degradación de Securina mediada por APC/C:Cdc20	[PSMB3, PSMB6, UBE2D1]	8,02E-07
Degradación de Cdc20 y otras proteínas objetivo de APC/C:Cdh1 mediada por APC/C:Cdh1 en mitosis tardía/G1 temprana	[PSMB3, PSMB6, UBE2D1]	8,02E-07

Degradación de la ciclina A mediada por Cdc20:APC/C fosforilado	[PSMB3, PSMB6, UBE2D1]	8,02E-07
Degradación de proteínas del ciclo celular mediada por APC:Cdc20 antes de la satisfacción del punto de control del ciclo celular	[PSMB3, PSMB6, UBE2D1]	8,02E-07
Señalización del TCR	[PSMB3, PSMB6, RIPK2, TAB2, UBE2D1]	8,02E-07
Señalización aguas abajo del TCR	[PSMB3, PSMB6, RIPK2, TAB2, UBE2D1]	8,02E-07
Activación de NF-κB mediada por FCER1	[PSMB3, PSMB6, TAB2, UBE2D1]	8,02E-07
AUF1 (hnRNP D0) se une y desestabiliza el mRNA	[HNRNPD, PSMB3, PSMB6]	8,02E-07
Regulación de la estabilidad del mRNA por proteínas que se unen a elementos ricos en AU	[EXOSC5, HNRNPD, PSMB3, PSMB6]	8,02E-07
Fosforilación y eliminación de Cdc6 mediada por CDK	[PSMB3, PSMB6, UBE2D1]	8,02E-07
Transporte de mRNA maduro derivado de un transcrito que contiene intrones	[CHTOP, RNPS1, SRSF3]	1,40E-03
Procesamiento del extremo 3' del mRNA	[CHTOP, RNPS1, SRSF3]	1,40E-03
Terminación de la transcripción por ARN polimerasa II	[CHTOP, RNPS1, SRSF3]	1,40E-03

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 7. Rutas Reactome de la comparación EM con HC. Clúster 6. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 6**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EM y sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	p _{adj.} *
Las RMT metilan argininas de histonas	[H2AC18, H2AC20, SMARCB1, SMARCD2]	1,40E-05
Transporte de mRNAs maduros derivados de transcritos sin intrones	[EIF4E, NUP58, NUP93]	4,47E-05
Transporte del mRNA maduro dependiente de SLBP	[EIF4E, NUP58, NUP93]	5,12E-05
Transporte del mRNA maduro independiente de SLBP	[EIF4E, NUP58, NUP93]	5,46E-05
SUMOilación de proteínas ubiquitiniladas	[NUP58, NUP93, PML]	5,48E-05
Transporte de mRNA maduro derivado de un transcrito sin intrones	[EIF4E, NUP58, NUP93]	5,53E-05

Anexo II

Mecanismo antiviral de ISG15	[EIF4E, NUP58, NUP93]	7,57E-05
Regulación de la respuesta al choque térmico mediada por HSF1	[HSPA2, NUP58, NUP93]	1,33E-04

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 8. Rutas Reactome de la comparación EMRR con HC. Clúster 1. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 1**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR y sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	p _{adj.} *
Ruta principal del procesamiento de ARNr en el nucleolo y el citosol	[RPL11, RPL14, RPL15, RPL17, RPL21, RPL24, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL32, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL4, RPL5, RPL9, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9]	1,40E-45
Señalización por receptores ROBO	[RPL11, RPL14, RPL15, RPL17, RPL21, RPL24, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL32, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL4, RPL5, RPL9, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9, UBC]	2,80E-45
Procesamiento de ARNr en el núcleo y el citosol	[RPL11, RPL14, RPL15, RPL17, RPL21, RPL24, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL32, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL4, RPL5, RPL9, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9]	4,20E-45
Procesamiento de ARNr	[RPL11, RPL14, RPL15, RPL17, RPL21, RPL24, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL32, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL4, RPL5, RPL9, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9]	2,66E-44
Metabolismo de aminoácidos y derivados	[RPL11, RPL14, RPL15, RPL17, RPL21, RPL24, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL32, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL4, RPL5, RPL9, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9]	3,28E-35

Formación del complejo ternario y, posteriormente, del complejo 43S	[EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, [RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, [RPS6, RPS7, RPS9]	8,52E-32
Guía axonal	[RPL11, RPL14, RPL15, RPL17, RPL21, RPL24, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL32, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL4, RPL5, RPL9, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9, UBC]	3,50E-31
Desarrollo del sistema nervioso	[RPL11, RPL14, RPL15, RPL17, RPL21, RPL24, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL32, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL4, RPL5, RPL9, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9, UBC]	1,38E-30
Formación del complejo de inicio de la traducción	[EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, [RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9]	1,43E-30
Escaneo ribosómico y reconocimiento del codón de inicio	[EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, [RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9]	1,43E-30
Activación del ARNm mediante unión del complejo de unión al cap y los eIFs, y posterior unión al 43S	[EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3M, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, [RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, [RPS6, RPS7, RPS9]	1,80E-30
Metabolismo de ARN	[EFTUD2, RPL11, RPL14, RPL15, RPL17, RPL21, RPL24, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL32, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL4, RPL5, RPL9, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9, UBC]	6,91E-30
Respuestas celulares al estrés	[EEF1A1, RPL11, RPL14, RPL15, RPL17, RPL21, RPL24, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL32, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL4, RPL5, RPL9, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9, UBC, XBP1]	3,94E-29
Respuestas celulares a estímulos	[EEF1A1, RPL11, RPL14, RPL15, RPL17, RPL21, RPL24, RPL26, RPL26L1, RPL31, RPL32, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL4, RPL5, RPL9, RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9, UBC, XBP1]	6,67E-29

Anexo II

El SARS-CoV-2 modula la maquinaria de traducción del hospedador	[RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9]	1,91E-23
Interacciones entre SARS-CoV-2 y el hospedador	[RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, [RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9, UBC]	3,11E-15
Infección por SARS-CoV-2	[RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9, UBC]	6,09E-13
Infecciones por SARS-CoV	[RPS10, RPS11, RPS15A, RPS17, RPS18, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27A, RPS27L, RPS3, RPS3A, RPS6, RPS7, RPS9, UBC]	2,01E-11
Autofagia mediada por chaperonas	[EEF1A1, RPS27A, UBC]	5,61E-04
Traducción mitocondrial	[MRPL2, MRPL4, MRPS14, MRPS15]	1,84E-03
Inicio de la traducción mitocondrial	[MRPL2, MRPL4, MRPS14, MRPS15]	2,15E-03
Elongación de la traducción mitocondrial	[MRPL2, MRPL4, MRPS14, MRPS15]	2,15E-03
Terminación de la traducción mitocondrial	[MRPL2, MRPL4, MRPS14, MRPS15]	2,15E-03
Modificación de ARNr en el núcleo y el citosol	[RPS6, RPS7, RPS9]	2,88E-03

* p_{adj} . significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 9. Rutas Reactome de la comparación EMRR con HC. Clúster 2. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 2**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR y sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p_{adj} .
Señalización de interleucina-10	[CCL2, CCL3, CCL4, CCL3L3, CXCL1, CXCL3, CXCL10, CXCL2, CXCL8, ICAM1, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, PTGS2, TNF, TNFRSF1A]	8,69E-30
Señalización por interleucinas	[CASP1, CCL2, CCL3, CCL4, CD86, CSF1, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8, HIF1A, ICAM1, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, JUN, NFKBIA, NOD2, PSMA5, PSMD14, PTGS2, SOCS3, STAT1, TCP1, TNF, TNFRSF1A]	2,17E-26

Señalización de citoquinas en el sistema inmunitario	[CASP1, CCL2, CCL3, CCL4, CD44, CD86, CSF1, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8, HIF1A, ICAM1, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IRF1, JUN, NFKBIA, NOD2, PSMA5, PSMD14, PTGS2, SOCS3, STAT1, TCP1, TNF, TNFRSF1A]	2,67E-24
Señalización de interleucina-4 e interleucina-13	[CCL2, CXCL8, HIF1A, ICAM1, IL1A, IL1B, IL6, PTGS2, SOCS3, STAT1, TNF]	3,10E-12
Los receptores de quimiocinas se unen a quimiocinas	[CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8]	4,09E-08
Señalización de la familia de interleucina-1	[CASP1, IL1A, IL1B, IL1RN, NFKBIA, NOD2, PSMA5, PSMD14]	9,11E-07
Señalización de interleucina-1	[IL1A, IL1B, IL1RN, NFKBIA, NFKBIZ, NFKB2, PSMD14]	1,91E-06
Señalización purinérgica en la infección por leishmaniasis	[CASP1, IL1A, IL1B, NLRP3]	4,64E-05
Reclutamiento celular (respuesta proinflamatoria)	[CASP1, IL1A, IL1B, NLRP3]	4,64E-05
Piroptosis	[CASP1, IL1A, IL1B, IL1R1]	5,99E-05
Procesamiento de interleucina-1	[CASP1, IL1A, IL1B]	6,98E-05
Señalización de interleucina-6	[IL6, SOCS3, STAT1]	1,28E-04
Señalización por interferón gamma	[CD44, ICAM1, IRF1, SOCS3, STAT1]	3,24E-04
Necrosis regulada	[CASP1, IL1A, IL1B, IRF1]	8,30E-04
Señalización de la familia de interleucina-6	[IL6, SOCS3, STAT1]	1,24E-03
Interconversión de nucleótidos di- y trifosfato	[AK2, CTPS1, NME1]	2,25E-03
Respuesta celular a la hipoxia	[HIF1A, PSMA5, PSMD14]	2,78E-03
Cascada TLR4 independiente de MyD88	[JUN, NFKBIA, NOD2, TLR4]	3,53E-03
Señalización de TLR4 mediada por TRIF (TICAM1)	[JUN, NFKBIA, NOD2, TLR4]	3,53E-03
Cascada del receptor tipo Toll 7/8 (TLR7/8)	[JUN, NFKBIA, NOD2, TLR4]	3,58E-03
Cascada del receptor tipo Toll 9 (TLR9)	[JUN, NFKBIA, NOD2, TLR4]	3,59E-03
Cascada dependiente de MyD88 iniciada en endosoma	[JUN, NFKBIA, NOD2, TLR4]	3,81E-03
Inducción mediada por TRAF6 de NF-kappaB y quinasas MAP tras activación de TLR7/8 o 9	[JUN, NFKBIA, NOD2, TLR4]	4,02E-03
Regulación de la expresión y actividad de RUNX2	[PSMA5, PSMD14, STAT1]	5,14E-03

Anexo II

Señalización por interferón alfa/beta	[IRF1, SOCS3, STAT1]	7,42E-03
Vías de señalización de receptores NLR (dominio de unión a nucleótidos con repeticiones ricas en leucina)	[CASP1, NLRP3, NOD2]	7,57E-03
Activación de NF-kappaB en células B	[NFKBIA, PSMA5, PSMD14]	8,05E-03
Hidroxilación de prolina dependiente de oxígeno del factor inducible por hipoxia alfa	[HIF1A, PSMA5, PSMD14]	9,63E-03

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 10. Rutas Reactome de la comparación EMRR con HC. Clúster 3. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 3**, identificado mediante ClueGO, para genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR y sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj.}
Transporte electrónico respiratorio, síntesis de ATP por acoplamiento quimiosmótico y producción de calor por proteínas desacoplantes	[ATP5ME, ATP5MF, COX6C, COX7B, [NDUFA13, NDUFA5, NDUFB1, NDUFB3, [NDUFB4, NDUFS2, NDUFS8, UQCRB, UQCRC1, UQCRCQ]	1,84E-14
Degradación de Securina mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	5,36E-13
Degradación de la ciclina A mediada por Cdc20:fosfo-APC/C	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	1,21E-12
Fosforilación mediada por CDK y eliminación de Cdc6	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC6, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	1,21E-12
Degradación de Cdc20 y otras proteínas diana de APC/C:Cdh1 en mitosis tardía/inicio de G1	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, [CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	1,40E-12

Degradación de proteínas del ciclo celular mediada por APC/Cdc20 antes de la activación del punto de control	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	1,40E-12
Transporte electrónico respiratorio	[COX6C, COX7B, NDUFA13, NDUFA5, NDUFB1, NDUFB3, NDUFB4, NDUFS2, NDUFS8, UQCRB, UQCRC1, UQCRCQ]	1,63E-12
Degradación de proteínas mitóticas mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	1,86E-12
El ciclo del ácido cítrico (TCA) y transporte electrónico respiratorio	[ATP5ME, ATP5MF, COX6C, COX7B, NDUFA13, NDUFA5, NDUFB1, NDUFB3, NDUFB4, NDUFS2, NDUFS8, UQCRB, UQCRC1, UQCRCQ]	2,07E-12
Activación de APC/C y degradación de proteínas mitóticas mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	2,12E-12
Regulación de los activadores de APC/C entre G1/S y la anafase temprana	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	3,75E-12
Degradación mediada por APC/C de proteínas del ciclo celular	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	9,57E-12
Regulación del ciclo celular mitótico	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	9,57E-12
Autodegradación de Cdh1 por Cdh1:APC/C	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	1,34E-11
Cambio de los orígenes a un estado posreplicativo	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC6, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	1,55E-11
Síntesis de ADN	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC6, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	3,31E-10
Fase S	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC6, MYC, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	3,83E-10
Ensamblaje del complejo prerreplicativo	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC6, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	2,03E-09
Preinicio de la replicación del ADN	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC6, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	6,81E-09
Conversión de APC/C:Cdc20 a APC/C:Cdh1 en anafase tardía	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, UBE2E1]	1,71E-08
Inhibición de la actividad proteolítica de APC/C requerida para el inicio de la anafase por	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, UBE2E1]	2,35E-08

Anexo II

componentes del punto de control del huso		
mitótico		
Inactivación de APC/C mediante inhibición directa del complejo APC/C	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, UBE2E1]	2,35E-08
Replicación del ADN	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC6, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	3,72E-08
Separación de cromátidas hermanas	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	4,34E-08
Degradación de la ciclina B mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, UBE2E1]	5,54E-08
Degradación de Nek2A mediada por APC-Cdc20	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, UBE2E1]	9,27E-08
Puntos de control del ciclo celular	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, CDC6, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	3,08E-07
Biogénesis del complejo I	[NDUFA13, NDUFA5, NDUFB1, NDUFB3, NDUFB4, NDUFS2, NDUFS8]	3,70E-07
Anafase mitótica	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	3,79E-07
Metafase y anafase mitótica	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, UBE2E1]	3,91E-07
Fosforilación de APC/C	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, UBE2E1]	1,46E-06
Regulación aberrante de la salida de mitosis en cáncer debido a defectos en RB1	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, UBE2E1]	1,46E-06
Inicio de la traducción mitocondrial	[MRPL35, MRPL42, MRPL51, MRPS23, MRPS24, MRPS28, MRPS33]	6,95E-06
Elongación de la traducción mitocondrial	[MRPL35, MRPL42, MRPL51, MRPS23, MRPS24, MRPS28, MRPS33]	6,95E-06
Terminación de la traducción mitocondrial	[MRPL35, MRPL42, MRPL51, MRPS23, MRPS24, MRPS28, MRPS33]	6,95E-06
Degradación de Emi1 mediada por SCF-beta-TrCP	[CDC20, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	9,54E-06
Traducción mitocondrial	[MRPL35, MRPL42, MRPL51, MRPS23, MRPS24, MRPS28, MRPS33]	1,07E-05
Señalización de la familia de interleucina-1	[MAPK8, NFKB2, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2, TBK1]	1,16E-05
NIK → señalización no canónica de NF-kB	[NFKB2, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,39E-05
Señalización no canónica de NF-kB mediada por Dectin-1	[NFKB2, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,52E-05

Señalización de CLEC7A (Dectin-1)	[CASP8, NFKB2, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,77E-05
Regulación aberrante del ciclo celular mitótico debido a defectos en RB1	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, UBE2E1]	2,96E-05
Enfermedades del ciclo celular mitótico	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, UBE2E1]	3,84E-05
Eliminación de Orc1 de la cromatina	[CDC6, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	3,91E-05
Regulación transcripcional por VENTX	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, UBE2E1]	4,24E-05
Eventos nucleares mediados por NFE2L2	[MYC, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	7,11E-05
Eventos asociados a la ciclina E durante la transición G1/S	[MYC, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	9,18E-05
Transición G1/S	[CDC6, MYC, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	9,33E-05
Eventos asociados a la ciclina A:Cdk2 en la entrada a la fase S	[MYC, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,04E-04
Respuesta celular al estrés químico	[COX6C, COX7B, MYC, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,06E-04
Presentación cruzada de antígenos exógenos solubles (endosomas)	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,21E-04
Regulación de PAK-2p34 activado mediante degradación mediada por proteasoma	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,28E-04
Señalización de MAPK6/MAPK4	[MYC, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,28E-04
Ruta ER-fagosoma	[B2M, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,31E-04
Receptores de lectina tipo C (CLRs)	[CASP8, NFKB2, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,33E-04
Regulación de la ornitina descarboxilasa (ODC)	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,36E-04
Degradación de CD4 mediada por Vpu	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,43E-04
Autodegradación de la ligasa E3 de ubiquitina COP1	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,43E-04

Anexo II

Degradación mediada por ubiquitina de Cdc25A fosforilada	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,43E-04
Respuesta al daño en ADN independiente de p53	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,43E-04
Punto de control de daño en ADN en G1/S independiente de p53	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,43E-04
Degradación dependiente de ubiquitina de la ciclina D	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,43E-04
Degradación de NFE2L2 mediada por GSK3B y BTRC:CUL1	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,43E-04
Regulación de la apoptosis	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,54E-04
Fase G1 mitótica y transición G1/S	[CDC6, MYC, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,62E-04
Degradación de APOBEC3G mediada por Vif	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,65E-04
FBXL7 regula negativamente AURKA durante la entrada en mitosis y mitosis temprana	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,65E-04
Regulación negativa de la señalización de NOTCH4	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,65E-04
Regulación transcripcional por RUNX3	[MYC, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,66E-04
Degradación de AXIN	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,68E-04
Regulación de la expresión y actividad de RUNX3	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,68E-04
AUF1 (hnRNP D0) se une y desestabiliza el ARNm	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,79E-04
Los mutantes de Hh son degradados por ERAD	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,79E-04
Degradación de DVL	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,90E-04
Estabilización de p53	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	1,90E-04
Metabolismo de poliaminas	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,07E-04
Los mutantes de Hh impiden la secreción del ligando	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,07E-04

Vía no canónica de NF-κB mediada por TNFR2	[NFKB2, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,07E-04
Vía KEAP1-NFE2L2	[MYC, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,07E-04
Señalización de interleucina-1	[NFKB2, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,12E-04
Procesamiento de antígenos — presentación cruzada	[B2M, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,16E-04
Degradación mediada por SCF(Skp2) de p27/p21	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,18E-04
Degradación de GLI1 por el proteasoma	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,18E-04
Degradación de GLI2 por el proteasoma	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,18E-04
GLI3 se procesa a GLI3R por el proteasoma	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,18E-04
El defecto en CFTR causa fibrosis quística	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,22E-04
Localización asimétrica de proteínas PCP	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,72E-04
Hidroxilación de prolina dependiente de oxígeno del factor inducible por hipoxia alfa	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,84E-04
Biogénesis de ligando Hedgehog	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,84E-04
Respuesta al daño en ADN dependiente de p53 en G1	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,84E-04
Punto de control de daño en ADN dependiente de p53 en G1/S	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,84E-04
Punto de control del huso mitótico	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, CDC20, UBE2E1]	2,88E-04
Activación de NF-kappaB en células B	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	2,94E-04
Regulación de RAS por GAPs	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	3,04E-04
Puntos de control de daño en ADN en G1/S	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	3,04E-04
Regulación de la estabilidad y actividad de PTEN	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	3,13E-04
Regulación de la expresión y actividad de RUNX2	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	3,94E-04
Respuesta celular a la hipoxia	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	4,30E-04

Anexo II

Trastornos de transportadores ABC	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	4,46E-04
Interacciones del hospedador con factores del VIH	[B2M, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	4,52E-04
El papel de GTSE1 en la progresión G2/M tras el punto de control G2	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	4,65E-04
Señalización del receptor Fc épsilon (FCERI)	[MAPK8, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	4,80E-04
Estado "on" de Hedgehog	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	4,89E-04
Eventos de señalización posteriores al receptor de células B (BCR)	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	5,02E-04
Degradación de beta-catenina por el complejo de destrucción	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	5,02E-04
Activación de NF-kB mediada por FCERI	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	5,05E-04
Señalización por NOTCH4	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	5,05E-04
Regulación de PTEN	[EGR1, PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	5,06E-04
Regulación de la estabilidad del ARNm por proteínas que se unen a elementos ricos en AU	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	5,33E-04
Vía PCP/CE	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	6,05E-04
Señalización aguas abajo del receptor de células T (TCR)	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	7,45E-04
Transporte mediado por proteínas de la familia ABC	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	7,55E-04
Regulación transcripcional por RUNX2	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	8,07E-04
Proteasas UCH	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	8,11E-04
Estado "off" de Hedgehog	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	8,78E-04
Señalización del receptor de células T (TCR)	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	9,70E-04
Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC16, ANAPC7, UBE2E1]	9,82E-04

Señalización por el receptor de células B (BCR)	[PSMA4, PSMA6, PSMB3, PSMD11, PSME2]	9,82E-04
Cascada TLR4 independiente de MyD88	[CASP8, MAPK8, NFKB2, TBK1]	2,00E-03
Señalización de TLR4 mediada por TRIF (TICAM1)	[CASP8, MAPK8, NFKB2, TBK1]	2,00E-03
Los receptores de quimiocinas se unen a quimiocinas	[CCL3L1, CCL7, CCRL2]	2,34E-03
Cascada del receptor tipo Toll 3 (TLR3)	[CASP8, MAPK8, NFKB2, TBK1]	2,47E-03

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 11. Rutas Reactome de la comparación EMRR con HC. Clúster 4. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 4**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR y sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj.}
Empalme de ARNm — Vía principal	[HNRNPM, PUF60, RNPS1, SF3A1, SRRM1, SRSF11, SRSF3, SRSF7, TRA2B]	1,21E-12
Empalme de ARNm	[HNRNPM, PUF60, RNPS1, SF3A1, SRRM1, SRSF11, SRSF3, SRSF7, TRA2B]	1,53E-12
Procesamiento del extremo 3' del ARNm	[RNPS1, SRRM1, SRSF11, SRSF3, SRSF7]	3,80E-08
Terminación de la transcripción por ARN polimerasa II	[RNPS1, SRRM1, SRSF11, SRSF3, SRSF7]	6,29E-08
Transporte de ARNm maduro derivado de un transcrito que contiene intrones	[RNPS1, SRRM1, SRSF11, SRSF3, SRSF7]	7,77E-08
Transporte del transcrito maduro al citoplasma	[RNPS1, SRRM1, SRSF11, SRSF3, SRSF7]	9,21E-08
Biogénesis del complejo I	[COA1, NDUFAB1, NDUFAF2]	4,76E-05

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 12. Rutas Reactome de la comparación EMRR con HC. Clúster 5. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 5**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR y sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj.}
Señalización por interferones	[GBP1, GBP2, GBP3, IFIT2, IFIT3, RNASEL, SAMHD1, TYK2]	1,93E-13
Señalización por interferón alfa/beta	[GBP2, IFIT2, IFIT3, RNASEL, SAMHD1, TYK2]	5,61E-12

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 13. Rutas Reactome de la comparación EMRR con HC. Clúster 6. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 6**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR y sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj.}
Tráfico retrógrado del Golgi al RE dependiente de COPI	[ARFGAP1, ARFGAP2, KIF11, KLC1]	3,24E-05
Transporte retrógrado del Golgi al RE	[ACTR10, ACTR1A, ARFGAP1, ARFGAP2, CAPZB, KIF11, KLC1]	2,18E-09
Presentación de antígenos por MHC clase II	[ACTR10, ACTR1A, CAPZB, KIF11, KLC1]	2,69E-06
Ciclo de chaperonas HSP90 para receptores de hormonas esteroideas (SHR) en presencia de ligando	[ACTR10, ACTR1A, CAPZB]	6,53E-05
Transporte anterógrado mediado por COPI	[ACTR10, ACTR1A, ARFGAP1, ARFGAP2, CAPZB]	1,26E-06
Tráfico retrógrado del Golgi al RE independiente de COPI	[ACTR10, ACTR1A, CAPZB]	1,04E-04

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 14. Rutas Reactome de la comparación EMSP con HC. Clúster 1. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 1**, identificado mediante ClueGO, para genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y los **sujetos control**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj.}
Silenciamiento traduccional mediado por L13a de la expresión de ceruloplasmina	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Elongación de la traducción en eucariotas	[EEF1D, EEF2, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Elongación de la cadena peptídica	[EEF2, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Infección por el virus de la influenza	[ISG15, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Transcripción y replicación del ARN viral de la influenza	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Direccionamiento cotraduccional dependiente de SRP de proteínas a la membrana	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, SEC61A1, SEC61B]	4,80E-38
Traducción de ARNm viral	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Metabolismo de aminoácidos que contienen selenio	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38

Anexo II

Síntesis de selenocisteína	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Señalización por receptores ROBO	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, UBB, UBC]	4,80E-38
Guía axonal	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, UBB, UBC]	4,80E-38
Ruta principal del procesamiento de ARNr en el nucleolo y el citosol	[IMP3, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPP38, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, SNU13]	4,80E-38
Metabolismo de aminoácidos y derivados	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Procesamiento de ARNr	[IMP3, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPP38, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, SNU13]	4,80E-38
Inicio de la traducción en eucariotas	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF5B, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Formación de un reservorio de subunidades 40S libres	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Hidrólisis de GTP y unión con la subunidad ribosómica 60S	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF5B, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38

Inicio de la traducción dependiente del cap	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF5B, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Terminación de la traducción en eucariotas	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Traducción	[EEF1D, EEF2, EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF5B, MRPL1, MRPL15, MRPL16, MRPL2, MRPL3, MRPL4, MRPS11, MRPS14, MRPS15, MRPS2, MRPS5, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, SEC61A1, SEC61B]	4,80E-38
Procesamiento de ARNr en el núcleo y el citosol	[IMP3, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPP38, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, SNU13]	4,80E-38
Metabolismo de ARN	[EFTUD2, IMP3, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPP38, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, SNU13, UBB, UBC]	4,80E-38
Regulación de la expresión de SLITs y ROBOs	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, UBB, UBC]	4,80E-38
Degradación mediada por codones sin sentido (NMD)	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Respuesta de EIF2AK4 (GCN2) a la deficiencia de aminoácidos	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Desarrollo del sistema nervioso	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, UBB, UBC]	4,80E-38

Anexo II

Respuesta celular a la privación de nutrientes	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
NMD independiente del complejo de empalme (EJC)	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,80E-38
Respuestas celulares al estrés	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, UBB, UBC]	4,80E-38
Respuestas celulares a estímulos	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, UBB, UBC]	4,80E-38
Enfermedad infecciosa	[EEF2, ISG15, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, UBB, UBC]	4,80E-38
Formación del complejo ternario y, posteriormente, del complejo 43S	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,25E-23
Formación del complejo de inicio de la traducción	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,25E-23
Exploración ribosomal y reconocimiento del codón de inicio	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,25E-23
Activación del ARNm por unión del complejo de unión al cap y los eIFs, y su posterior unión al 43S	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,25E-23
Biología del desarrollo	[RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL23, RPL26, RPL26L1, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL38, RPL4, RPL5, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, UBB, UBC]	4,80E-38
El SARS-CoV-2 modula la maquinaria de traducción del hospedador	[RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9]	4,25E-23
Interacciones entre SARS-CoV-2 y el hospedador	[ISG15, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, UBB, UBC]	4,25E-23
Infección por SARS-CoV-2	[ISG15, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, UBB, UBC]	4,25E-23

Infecciones por SARS-CoV	[ISG15, RPS11, RPS15, RPS15A, RPS18, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27L, RPS28, RPS29, RPS3, RPS3A, RPS7, RPS8, RPS9, UBB, UBC]	4,25E-23
Inicio de la traducción mitocondrial	[MRPL1, MRPL15, MRPL16, MRPL2, MRPL3, MRPL4, MRPS11, MRPS14, MRPS15, MRPS2, MRPS5]	6,33E-09
Elongación de la traducción mitocondrial	[MRPL1, MRPL15, MRPL16, MRPL2, MRPL3, MRPL4, MRPS11, MRPS14, MRPS15, MRPS2, MRPS5]	6,33E-09
Terminación de la traducción mitocondrial	[MRPL1, MRPL15, MRPL16, MRPL2, MRPL3, MRPL4, MRPS11, MRPS14, MRPS15, MRPS2, MRPS5]	6,33E-09
Traducción mitocondrial	[MRPL1, MRPL15, MRPL16, MRPL2, MRPL3, MRPL4, MRPS11, MRPS14, MRPS15, MRPS2, MRPS5]	6,33E-09
Modificación de ARNr en el núcleo y el citosol	[IMP3, RPS2, RPS7, RPS9, SNU13]	3,19E-05
DUBs del dominio Josephin	[RAD23B, UBB, UBC]	6,05E-05
Mecanismo antiviral mediado por ISG15	[ISG15, UBB, UBC]	6,05E-05
Vía de señalización de TNFR1 inducida por NF-kappaB	[RACK1, UBB, UBC]	6,05E-05
Señalización de TNF	[RACK1, UBB, UBC]	6,05E-05
Elusión del daño en el ADN	[ISG15, UBB, UBC]	6,05E-05
Terminación de la síntesis de ADN por translesión	[ISG15, UBB, UBC]	6,05E-05
Formación del complejo de incisión en GG-NER	[RAD23B, UBB, UBC]	6,05E-05
Ruta ER-fagosome	[SEC61A1, SEC61B, UBB, UBC]	6,05E-05
Mecanismo antiviral mediado por genes estimulados por IFN	[ISG15, OASL, UBB, UBC]	6,05E-05
Síntesis por translesión por polimerasas de ADN de la familia Y que eluden lesiones en la plantilla de ADN	[ISG15, UBB, UBC]	6,05E-05
Reconocimiento del daño en el ADN en GG-NER	[RAD23B, UBB, UBC]	6,05E-05
Recorte de N-glicanos en el RE y ciclo de calnexina/calreticulina	[RAD23B, UBB, UBC]	6,05E-05
Regulación de la señalización de TNFR1	[RACK1, UBB, UBC]	6,05E-05
Reguladores negativos de la señalización de DDX58/IFIH1	[ISG15, UBB, UBC]	6,05E-05

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 15. Rutas Reactome de la comparación EMSP con HC. Clúster 2. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 2**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y los **sujetos control**. Se muestran las 30 rutas más significativas.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj.}
Señalización de citoquinas en el sistema inmunitario	[AKT1, APP, B2M, BCL2L1, BCL2L11, BIRC3, CCL22, CD4, CD44, CXCL1, CXCL10, CXCL8, EGR1, ELOC, FCGR1A, FOXO3, HAVCR2, HMGB1, HMOX1, ICAM1, IFNAR1, IFNGR1, IKBKB, IL10, IL10RA, IL1B, IL1RN, IL6, IRAK1, IRF3, IRF5, IRF8, ITGAM,	2,16E-32

Sistema inmunitario	JUN, MAPK14, MCL1, MMP9, MYC, MYD88, NFKBIB, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, PTGS2, SEM1, SOCS3, STAT1, STAT2, STAT6, TBK1, TCP1, TIMP1, TNFRSF12A, TNFRSF1A, TNFSF12, TNFSF13B, TNFSF14, TYK2, UBE2D1] [AKT1, APP, ATG5, B2M, BCL2L1, BCL2L11, BECN1, BIRC3, CASP8, CCL22, CD1D, CD4, CD44, CLEC7A, CXCL1, CXCL10, CXCL8, CXCR2, CYBB, EGR1, ELOC, FADD, FCGR1A, FCGR2A, FCGR2B, FOXO3, HAVCR2, HMGB1, HMOX1, ICAM1, IFIH1, IFNAR1, IFNGR1, IKBKB, IL10, IL10RA, IL1B, IL1RN, IL6, IRAK1, IRF3, IRF5, IRF8, ITGAM, JUN, LGALS3, LY96, MAPK14, MCL1, MMP9, MYC, MYD88, NFKBIB, NFKBIE, PCBP2, PDCD1, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, PTGS2, SELL, SEM1, SOCS3, STAT1, STAT2, STAT6, TBK1, TCP1, TICAM1, TIMP1, TLR4, TNFAIP3, TNFRSF12A, TNFRSF1A, TNFSF12, TNFSF13B, TNFSF14, TREM1, TUBB, TXN, TYK2, UBE2D1, UBE2S, UBE3A, WWP1]	1,89E-26
Señalización por interleucinas	[AKT1, APP, BCL2L1, CCL22, CD4, CXCL1, CXCL10, CXCL8, FOXO3, HAVCR2, HMGB1, HMOX1, ICAM1, IKBKB, IL10, IL10RA, IL1B, IL1RN, IL6, IRAK1, ITGAM, JUN, MAPK14, MCL1, MMP9, MYC, MYD88, NFKBIB, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, PTGS2, SEM1, SOCS3, STAT1, STAT2, STAT6, TBK1, TCP1, TIMP1, TNFRSF1A, TYK2]	5,63E-24
Empalme de ARNm – Vía principal	[DDX5, DHX15, FUS, HNRNPA3, HNRNPD, HNRNPH1, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, MAGOH, PABPN1, PCBP2, PTBP1, SF1, SF3B1, SNRNP70, SNRPA, SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF5, SRSF6, SRSF7, SRSF9, TRA2B, U2AF2]	3,63E-18
Empalme de ARNm	[DDX5, DHX15, FUS, HNRNPA3, HNRNPD, HNRNPH1, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, MAGOH, PABPN1, PCBP2, PTBP1, SF1, SF3B1, SNRNP70, SNRPA, SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF5, SRSF6, SRSF7, SRSF9, TRA2B, U2AF2]	1,10E-17
Metabolismo de ARN	[AKT1, APOBEC3B, DDX21, DDX39B, DDX5, DHX15, EBNA1BP2, EIF4B, FUS, HNRNPA3, HNRNPD, HNRNPH1, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, KHSRP, MAGOH, MAPK14, NOP2, NSUN6, PABPN1, PCBP2, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, PTBP1, RAN, SEM1, SF1, SF3B1, SNRNP70, SNRPA, SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF5, SRSF6, SRSF7, SRSF9, TRA2B, U2AF2]	1,20E-16
Procesamiento de pre-ARNm con cap y que contiene intrones	[DDX39B, DDX5, DHX15, FUS, HNRNPA3, HNRNPD, HNRNPH1, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, MAGOH, PABPN1, PCBP2, PTBP1, SF1, SF3B1, SNRNP70, SNRPA, SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF5, SRSF6, SRSF7, SRSF9, TRA2B, U2AF2]	4,54E-16
Señalización de interleucina-4 e interleucina-13	[AKT1, BCL2L1, CCL22, CXCL8, FOXO3, HMOX1, ICAM1, IL10, IL1B, IL6, ITGAM, MCL1, MMP9, MYC, PTGS2, SOCS3, STAT1, STAT6, TIMP1, TYK2]	5,95E-16
Señalización de interleucina-10	[CCL22, CXCL1, CXCL10, CXCL8, ICAM1, IL10, IL10RA, IL1B, IL1RN, IL6, PTGS2, TIMP1, TNFRSF1A, TYK2]	8,41E-14
Sistema inmunitario innato	[APP, ATG5, B2M, BCL2L1, BIRC3, CASP8, CD4, CD44, CLEC7A, CXCL1, CXCR2, CYBB, FADD, FCGR1A, FCGR2A, HMGB1, HMOX1, IFIH1, IKBKB, IL1B, IRAK1, IRF3, ITGAM, JUN, LGALS3, LY96, MAPK14, MMP9, MYD88, NFKBIB, PCBP2, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, SELL, SEM1, STAT6, TBK1, TICAM1, TLR4, TNFAIP3, TREM1, TUBB, TXN, UBE2D1]	2,41E-12
Cascada del receptor tipo Toll 4 (TLR4)	[APP, BIRC3, CASP8, FADD, HMGB1, IKBKB, IRAK1, IRF3, ITGAM, JUN, LY96, MAPK14, MYD88, NFKBIB, TBK1, TICAM1, TLR4, UBE2D1]	1,40E-11
Cascada TLR4 independiente de MyD88	[APP, BIRC3, CASP8, FADD, HMGB1, IKBKB, IRAK1, IRF3, JUN, LY96, MAPK14, NFKBIB, TBK1, TICAM1, TLR4, UBE2D1]	1,88E-11
Señalización del TLR4 mediada por TRIF (TICAM1)	[APP, BIRC3, CASP8, FADD, HMGB1, IKBKB, IRAK1, IRF3, JUN, LY96, MAPK14, NFKBIB, TBK1, TICAM1, TLR4, UBE2D1]	1,88E-11
Cascada TLR4 independiente de MyD88	[APP, BIRC3, CASP8, FADD, HMGB1, IKBKB, IRAK1, IRF3, JUN, LY96, MAPK14, NFKBIB, TBK1, TICAM1, TLR4, UBE2D1]	1,88E-11
Cascadas de receptores tipo Toll	[APP, BIRC3, CASP8, FADD, HMGB1, IKBKB, IRAK1, IRF3, ITGAM, JUN, LY96, MAPK14, MYD88, NFKBIB, TBK1, TICAM1, TLR4, UBE2D1]	1,99E-10
Enfermedad infecciosa	[AKT1, APP, B2M, BECN1, CD4, CXCR4, DDX5, DVL1, ELOC, FCGR1A, FCGR2A, HMOX1, IFIH1, IFNAR1, IFNGR1, IKBKB, IL10, IL1B, IL6, IRAK1, IRF3, JUN, MAP1LC3B, MAPK14, MET, NT5E, PABPN1, PDCD1, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, RAN, SEM1, SFPQ, STAT1, STAT2, TBK1, TUBB, TXN, TYK2]	8,66E-10

Cascada del receptor tipo Toll 3 (TLR3)	[APP, BIRC3, CASP8, FADD, HMGB1, IKKB, IRAK1, IRF3, JUN, MAPK14, NFKB1B, TBK1, TICAM1, UBE2D1]	2,50E-09
Inducción mediada por DDX58/IFIH1 de interferón alfa/beta	[APP, ATG5, CASP8, FADD, HMGB1, IFIH1, IKKB, IRF3, NFKB1B, PCBP2, TBK1, TNFAIP3, UBE2D1]	6,60E-09
Muerte celular programada	[AKT1, BCL2L1, BCL2L11, BIRC3, CASP8, CDKN2A, FADD, FAS, HMGB1, IL1B, LY96, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, SEM1, TICAM1, TLR4]	2,72E-08
Procesamiento del extremo 3' del ARNm	[DDX39B, MAGOH, PABPN1, SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF5, SRSF6, SRSF7, SRSF9, U2AF2]	4,24E-08
Respuestas celulares al estrés	[AKT1, ATM, BLVRB, CDKN2A, CXCL8, CYBB, EGLN1, EGLN3, EIF2AK3, ELOC, H3-3B, HMOX1, IL6, JUN, KHSRP, LIMD1, LY96, MAP1LC3B, MAPK14, MDM2, MYC, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, SEM1, SIRT1, TLR4, TXN, UBE2D1, UBE2S, UFD1, WTIP]	6,48E-08
Respuestas celulares a estímulos	[AKT1, ATM, BLVRB, CDKN2A, CXCL8, CYBB, EGLN1, EGLN3, EIF2AK3, ELOC, H3-3B, HMOX1, IL6, JUN, KHSRP, LIMD1, LY96, MAP1LC3B, MAPK14, MDM2, MYC, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, SEM1, SIRT1, TLR4, TXN, UBE2D1, UBE2S, UFD1, WTIP]	1,01E-07
Señalización de interleucina-1	[APP, HMGB1, IKKB, IL1B, IL1RN, IRAK1, MYD88, NFKB1B, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, SEM1]	1,22E-07
Hidroxilación de prolina dependiente de oxígeno del factor inducible por hipoxia alfa	[EGLN1, EGLN3, ELOC, LIMD1, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, SEM1, UBE2D1, WTIP]	1,47E-07
Procesamiento de antígenos – presentación cruzada	[B2M, CYBB, FCGR1A, HMGB1, IKKB, LY96, MYD88, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, SEM1, TLR4]	1,55E-07
Desubiquitinación	[ADRM1, AXIN1, BECN1, BIRC3, BRCC3, CDK1, IFIH1, MDM2, MYC, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, RUVBL1, SEM1, TNFAIP3, TNKS, UBE2D1, UCHL3, UFD1]	1,71E-07
Apoptosis	[AKT1, BCL2L1, BCL2L11, CASP8, CDKN2A, FADD, FAS, HMGB1, LY96, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, SEM1, TICAM1, TLR4]	1,92E-07
Terminación de la transcripción por ARN polimerasa II	[DDX39B, MAGOH, PABPN1, SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF5, SRSF6, SRSF7, SRSF9, U2AF2]	2,04E-07
Vías de señalización de receptores NLR (dominio de unión a nucleótidos con repeticiones ricas en leucina)	[APP, BCL2L1, BIRC3, CASP8, HMOX1, IKKB, IRAK1, MAPK14, TNFAIP3, TXN]	5,71E-07
Señalización de la familia de interleucina-1	[APP, HMGB1, IKKB, IL1B, IL1RN, IRAK1, MYD88, NFKB1B, PSMB1, PSMD10, PSMD9, PSME3, SEM1, TBK1]	5,89E-07

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 16. Rutas Reactome de la comparación EMSP con HC. Clúster 3. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 3**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y los **sujetos control**. Se muestran las 30 más significativas

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p_{adj} .
Cambio de los orígenes a un estado post-replicativo	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1, UBE2E1]	8,51E-35
Regulación de los activadores del APC/C entre G1/S y la anafase temprana	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, SKP1, UBE2E1]	9,91E-35
Autodegradación de Cdh1 por Cdh1:APC/C	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, UBE2E1]	4,31E-34
Degradación mediada por APC/C de proteínas del ciclo celular	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, SKP1, UBE2E1]	1,36E-33
Regulación del ciclo celular mitótico	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, SKP1, UBE2E1]	1,36E-33
Degradación de Securina mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, UBE2E1]	2,76E-33
Degradación de la ciclina A mediada por Cdc20:fosfo-APC/C	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, UBE2E1]	2,34E-32
Fosforilación mediada por CDK y eliminación de Cdc6	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, UBE2E1]	2,34E-32
Degradación de la ciclina A mediada por Cdc20:fosfo-APC/C	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, UBE2E1]	2,34E-32
Degradación de Cdc20 y otras proteínas diana del APC/C:Cdh1 en mitosis tardía/inicio de G1	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, UBE2E1]	3,50E-32
Degradación mediada por APC:Cdc20 de proteínas del ciclo celular antes de la activación del punto de control	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, UBE2E1]	3,50E-32
Degradación de proteínas mitóticas mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, UBE2E1]	7,69E-32
Activación del APC/C y degradación de proteínas mitóticas mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, UBE2E1]	1,13E-31
Síntesis de ADN	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1, UBE2E1]	4,89E-31
Biogénesis del complejo I	[NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFA3, NDUFA5, NDUFA6, NDUFAB1, NDUFB1, NDUFB10, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB6, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8]	1,23E-29

Fase S	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, CDKN1A, CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1, UBE2E1]	1,21E-28
Regulación negativa de la señalización de NOTCH4	[CUL1, FBXW7, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1]	2,70E-28
Señalización por interleucinas	[CASP1, CCL2, CCL20, CCL3, CCL4, CCR1, CD36, CD80, CD86, CDKN1A, CSF1, CUL1, CXCL2, IL18, IL1A, IL1R1, ITGAX, ITGB2, MAPK9, NOD2, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1, SOD2]	8,13E-28
Respuesta celular al estrés químico	[COX5A, COX5B, COX6B1, COX7B, COX7C, CUL1, CYCS, KEAP1, NDUFA4, NLRP3, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1, SOD2]	8,56E-28
Señalización de citoquinas en el sistema inmunitario	[BIRC2, CASP1, CCL2, CCL20, CCL3, CCL4, CCR1, CD36, CD40, CD80, CD86, CDKN1A, CSF1, CUL1, CXCL2, EIF4A3, IL18, IL1A, IL1R1, IRF1, ITGAX, ITGB2, KPNB1, MAPK9, NOD2, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1, SOD2, UBE2E1]	7,66E-27
Replicación del ADN	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, CUL1, KPNB1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1, UBE2E1]	9,22E-27
Degradación de NFE2L2 mediada por GSK3B y BTRC:CUL1	[CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1]	9,36E-27
FBXL7 regula negativamente AURKA durante la entrada en mitosis y en la mitosis temprana	[CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1]	2,34E-26
Ensamblaje del complejo prerreplicativo	[ANAPC10, ANAPC11, ANAPC15, ANAPC16, ANAPC2, ANAPC5, ANAPC7, KPNB1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, UBE2E1]	9,79E-26
Degradación mediada por SCF(Skp2) de p27/p21	[CDKN1A, CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, SKP1]	2,88E-25
Degradación de GLI1 por el proteasoma	[CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1]	2,88E-25
Degradación de GLI2 por el proteasoma	[CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1]	2,88E-25
Procesamiento de GLI3 a GLI3R por el proteasoma	[CUL1, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1]	2,88E-25
Regulación de la expresión y actividad de RUNX2	[CUL1, FBXW7, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1]	4,74E-25
Señalización de interleucina-1	[CUL1, IL1A, IL1R1, NOD2, PSMA1, PSMA4, PSMA6, PSMB10, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC6, PSMD12, PSMD13, PSMD8, PSME1, PSME2, RBX1, SKP1]	9,02E-25

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 17. Rutas Reactome de la comparación EMSP con HC. Clúster 4. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 4**, identificado mediante ClueGO, para los genes con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y los **sujetos control**. Se muestran las 30 más significativas.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj.}
Escape del promotor por ARN polimerasa II	[CCNH, ERCC3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G, TAF11, TAF13, TAF15, TAF2, TAF5, TAF6, TAF9]	2,99E-23
Preiniciación de la transcripción y apertura del promotor por ARN polimerasa II	[CCNH, ERCC3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G, TAF11, TAF13, TAF15, TAF2, TAF5, TAF6, TAF9]	2,99E-23
Inicio de la transcripción por ARN polimerasa II	[CCNH, ERCC3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G, TAF11, TAF13, TAF15, TAF2, TAF5, TAF6, TAF9]	2,99E-23
Escape del promotor por ARN polimerasa II	[CCNH, ERCC3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G, TAF11, TAF13, TAF15, TAF2, TAF5, TAF6, TAF9]	2,99E-23
Preiniciación de la transcripción y apertura del promotor por ARN polimerasa II	[CCNH, ERCC3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G, TAF11, TAF13, TAF15, TAF2, TAF5, TAF6, TAF9]	2,99E-23
Inicio de la transcripción y liberación del promotor por ARN polimerasa II	[CCNH, ERCC3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G, TAF11, TAF13, TAF15, TAF2, TAF5, TAF6, TAF9]	2,99E-23
Eventos de pretranscripción de la ARN polimerasa II	[CCNH, ERCC3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G, TAF11, TAF13, TAF15, TAF2, TAF5, TAF6, TAF9]	2,99E-23
Señalización por interleucinas	[AGER, ANXA1, BCL6, CCL3L1, CCND1, HGF, IFNL1, IKKKG, IL12RB1, IL23A, IRF4, ITGB1, LCK, NFKB1, NFKBIA, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2, RIPK2, S100A12, SNRPA1, STAT3, STAT4]	2,99E-23
Regulación transcripcional por TP53	[AKT2, BCL6, CCNH, CHD4, ERCC3, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G, PTEN, TAF11, TAF13, TAF15, TAF2, TAF5, TAF6, TAF9, TNFRSF10B]	2,99E-23
Enfermedades de la transducción de señales por receptores de factores de crecimiento y segundos mensajeros	[AKT2, ATG7, BCL2A1, CTNNB1, EGF, GSK3B, HGF, LCK, NOTCH1, POLR2A, POLR2G, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2, PTEN, SRC, STAT3, TGFB1, TGFB2]	2,99E-23
La ARN polimerasa II transcribe genes de snARN	[GTF2A1, GTF2A2, POLR2A, POLR2G, SRRT, TAF11, TAF13, TAF5, TAF6, TAF8, TAF9]	2,99E-23
Fosforilación del CTD de la ARN polimerasa II e interacción con CE	[CCNH, ERCC3, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G]	7,43E-20
Capado del ARNm	[CCNH, ERCC3, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G]	1,14E-18
Formación del complejo de elongación temprana	[CCNH, ERCC3, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G]	3,74E-18
Regulación transcripcional por RUNX3	[CCND1, CTNNB1, ITGA4, NOTCH1, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2, RUNX1, SRC]	3,74E-18
Señalización aguas abajo del receptor de células T (TCR)	[IKKKG, LCK, NFKB1, NFKBIA, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2, PTEN, RIPK2]	1,20E-14
Formación del complejo de preincisión en TC-NER	[CCNH, COPS6, ERCC3, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G]	5,79E-14
Señalización de interleucina-1	[AGER, IKKKG, NFKB1, NFKBIA, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2, RIPK2, S100A12]	1,60E-13
Señalización de la familia de interleucina-1	[AGER, IKKKG, NFKB1, NFKBIA, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2, RIPK2, S100A12, STAT3]	1,29E-10

Receptores de lectina tipo C (CLRs)	[FCER1G, ICAM3, IKBKG, NFKB1, NFKBIA, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2, RELB, SRC]	3,86E-10
Regulación transcripcional de la diferenciación del adipocito blanco	[KLF4, MED10, MED15, MED24, MED25, MED26, MED30, MED7, MED8, NFKB1]	8,22E-10
Elongación de la transcripción del VIH	[CCNH, ERCC3, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G]	2,36E-09
Formación del complejo de elongación del VIH-1 que contiene HIV-1 Tat	[CCNH, ERCC3, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G]	2,36E-09
Señalización del receptor de células T (TCR)	[IKBKG, LCK, NFKB1, NFKBIA, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2, PTEN, RIPK2]	4,50E-09
Activación de NF-kappaB en células B	[IKBKG, NFKB1, NFKBIA, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2, REL]	1,42E-08
Señalización de CLEC7A (Dectin-1)	[IKBKG, NFKB1, NFKBIA, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2, RELB, SRC]	1,42E-08
Reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción (TC-NER)	[CCNH, COPS6, ERCC3, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G]	1,51E-08
Activación de NF-kB mediada por FCER1	[FCER1G, IKBKG, NFKB1, NFKBIA, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2]	1,89E-08
Eventos de señalización posteriores al receptor de células B (BCR)	[IKBKG, NFKB1, NFKBIA, PSMA3, PSMA5, PSMA7, PSMD11, PSMD2, REL]	2,99E-08
Formación del complejo de elongación de la ARN polimerasa II	[CCNH, ERCC3, GTF2H1, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, POLR2A, POLR2G]	3,24E-08

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 18. Rutas Reactome de la comparación EMSP con HC. Clúster 5. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 5**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y los **sujetos control**. Se muestran las 30 más significativas.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj.}
Los aminoácidos regulan mTORC1	[ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1C1, ATP6V1E1, ATP6V1G2, BMT2, FLCN, FNIP1, ITFG2, LAMTOR1, LAMTOR3, LAMTOR4, LAMTOR5, MIOS, MLST8, NPRL2, SLC38A9, TCIRG1, WDR59]	1,67E-26
Respuesta celular a la privación de nutrientes	[ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1C1, ATP6V1E1, ATP6V1G2, BMT2, FLCN, FNIP1, ITFG2, LAMTOR1, LAMTOR3, LAMTOR4, LAMTOR5, MIOS, MLST8, NPRL2, SLC38A9, TCIRG1, WDR59]	4,38E-17
Regulación dependiente de energía de mTOR por LKB1-AMPK	[LAMTOR1, LAMTOR3, LAMTOR4, LAMTOR5, MLST8, SLC38A9, TSC2]	1,02E-07
Regulación transcripcional del gen PTEN	[CBX8, HDAC7, LAMTOR1, LAMTOR3, LAMTOR4, LAMTOR5, MLST8, SLC38A9]	9,48E-07
Señalización por mTOR	[LAMTOR1, LAMTOR3, LAMTOR4, LAMTOR5, MLST8, SLC38A9, TSC2]	1,35E-06
Señalización mediada por mTORC1	[LAMTOR1, LAMTOR3, LAMTOR4, LAMTOR5, MLST8, SLC38A9]	1,47E-06

Anexo II

Reciclaje del receptor de insulina	[ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1C1, ATP6V1E1, ATP6V1G2, TCIRG1]	2,48E-06
Señalización por NOTCH	[H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, HDAC10, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HIF1A, SIRT6, TBL1X]	6,58E-06
Endocitosis y reciclaje de transferrina	[ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1C1, ATP6V1E1, ATP6V1G2, TCIRG1]	7,52E-06
Senescencia inducida por daño en el ADN o estrés en telómeros	[H1-0, H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, KAT5, RB1]	8,04E-06
Señalización por receptores nucleares	[ALDH1A1, FOSB, H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, KAT5, MYB, PPARD, PTK2, TBL1X, YY1]	1,06E-05
Producción de ROS y RNS en fagocitos	[ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1C1, ATP6V1E1, ATP6V1G2, TCIRG1]	1,90E-05
Regulación transcripcional de la granulopoyesis	[CEBPA, H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, MYB, PML]	2,01E-05
Las HDAC desacetilan histonas	[H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, HDAC10, SAP30L, TBL1X]	2,82E-05
Macroautofagia	[HDAC6, LAMTOR1, LAMTOR3, LAMTOR4, LAMTOR5, MLST8, SLC38A9, TSC2, VIM]	3,95E-05
Regulación de PTEN	[CBX8, HDAC7, LAMTOR1, LAMTOR3, LAMTOR4, LAMTOR5, MLST8, PML, SLC38A9]	5,02E-05
Expresión génica dependiente de estrógenos	[FOSB, H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, KAT5, MYB, YY1]	8,89E-05
Autofagia	[HDAC6, LAMTOR1, LAMTOR3, LAMTOR4, LAMTOR5, MLST8, SLC38A9, TSC2, VIM]	9,35E-05
El dominio intracelular de NOTCH1 regula la transcripción	[HDAC10, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HIF1A, TBL1X]	1,07E-04
Ruta de transcripción Notch-HLH	[HDAC10, HDAC6, HDAC7, HDAC9, TBL1X]	1,56E-04
El PIP3 activa la señalización de AKT	[CBX8, HDAC7, LAMTOR1, LAMTOR3, LAMTOR4, LAMTOR5, MLST8, NR4A1, PML, SLC38A9, TSC2]	1,90E-04
TP53 regula genes metabólicos	[LAMTOR1, LAMTOR3, LAMTOR4, LAMTOR5, MLST8, SLC38A9, TSC2]	2,41E-04
Señalización mediada por ESR	[FOSB, H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, KAT5, MYB, PTK2, YY1]	2,76E-04
Captación y transporte de hierro	[ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1C1, ATP6V1E1, ATP6V1G2, TCIRG1]	3,20E-04
El complejo B-WICH regula positivamente la expresión de ARNr	[H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, MYBBP1A, POLR1F]	3,20E-04
Eventos tempranos del HCMV	[DAXX, H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, PML, TBL1X]	4,06E-04
Procesamiento de extremos de roturas de doble cadena de ADN	[H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, KAT5, SIRT6, UBE2I]	4,82E-04
Senescencia celular	[CBX8, H1-0, H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, KAT5, RB1]	7,77E-04
Inhibición de la recombinación del ADN en los telómeros	[DAXX, H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1]	7,84E-04
Regulación epigenética de la expresión génica	[H2AC7, H2BC15, H2BC21, H2BC4, H2BU1, MYBBP1A, POLR1F, SAP30L]	8,20E-04

*p_{adj.} significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 19. Rutas Reactome de la comparación EMSP con HC. Clúster 6. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 6**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y los **sujetos control**. Se muestran las 30 más significativas.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj.}
Transporte retrógrado del Golgi al RE	[ACTR10, ACTR1A, ARF1, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP2, ARFGAP3, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, DCTN1, DCTN3, DCTN6, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1, KIF22, KIF5A, KLC1, KLC4]	1,20E-21
Presentación de antígenos por MHC clase II	[ACTR10, ACTR1A, ARF1, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, DCTN1, DCTN3, DCTN6, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1, HLA-DRA, HLA-DRB1, KIF22, KIF5A, KLC1, KLC4, RAB7A, SAR1B]	8,12E-21
Transporte anterógrado mediado por COPI	[ACTR10, ACTR1A, ARF1, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP2, ARFGAP3, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, DCTN1, DCTN3, DCTN6, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1]	9,07E-18
Tráfico intra-Golgi y retrógrado del Golgi al RE	[ACTR10, ACTR1A, ARF1, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP2, ARFGAP3, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, DCTN1, DCTN3, DCTN6, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1, KIF22, KIF5A, KLC1, KLC4]	9,76E-18
Tráfico de membranas	[ACTB, ACTR10, ACTR1A, AP3B1, ARF1, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP2, ARFGAP3, CALM1, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, COPS2, COPS7B, COPS8, DCTN1, DCTN3, DCTN6, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1, GPS1, KIF22, KIF5A, KLC1, KLC4, RAB7A, SAR1B]	3,42E-16
Transporte anterógrado del RE al Golgi	[ACTR10, ACTR1A, ARF1, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP2, ARFGAP3, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, DCTN1, DCTN3, DCTN6, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1, SAR1B]	6,09E-16
Transporte mediado por vesículas	[ACTB, ACTR10, ACTR1A, AP3B1, ARF1, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP2, ARFGAP3, CALM1, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, COPS2, COPS7B, COPS8, DCTN1, DCTN3, DCTN6, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1, GPS1, KIF22, KIF5A, KLC1, KLC4, RAB7A, SAR1B]	1,75E-15
Transporte al Golgi y modificación posterior	[ACTR10, ACTR1A, ARF1, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP2, ARFGAP3, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, DCTN1, DCTN3, DCTN6, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1, SAR1B]	1,66E-14
Tráfico retrógrado del Golgi al RE independiente de COPI	[ACTR10, ACTR1A, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, DCTN1, DCTN3, DCTN6, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1]	2,09E-12
Ciclo de chaperonas HSP90 para receptores de hormonas esteroides (SHR) en presencia de ligando	[ACTR10, ACTR1A, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, DCTN1, DCTN3, DCTN6, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1]	5,10E-12
Glucosilación unida a asparagina (N-linked)	[ACTR10, ACTR1A, ARF1, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP2, ARFGAP3, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, DCTN1, DCTN3, DCTN6, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1, SAR1B]	9,48E-11
Nedilación	[ASB6, COMMD10, COMMD3, COMMD4, COMMD7, COMMD8, COMMD9, COPS2, COPS7B, COPS8, DCAF6, DCAF8, GPS1, WDTG1]	4,88E-08
Señalización por fusiones de BRAF y RAF1	[ACTB, AP3B1, CALM1, CAMK2D, CLCN6, KDM7A, PAPSS1, TENT4A, TRAK1]	4,89E-08
Tráfico retrógrado del Golgi al RE dependiente de COPI	[ARF1, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP2, ARFGAP3, KIF22, KIF5A, KLC1, KLC4]	8,77E-08
Señalización oncogénica de MAPK	[ACTB, AP3B1, CALM1, CAMK2D, CLCN6, KDM7A, PAPSS1, TENT4A, TRAK1]	3,79E-07
Factores implicados en el desarrollo de megacariocitos y producción de plaquetas	[ACTB, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, HDAC1, KIF22, KIF5A, KLC1, KLC4, MFN1, WEE1]	1,21E-06

Macroautofagia	[ATG101, ATG4A, ATG4B, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1, GABARAPL1, MAP1LC3A, MFN1, RB1CC1]	1,92E-06
Autofagia	[ATG101, ATG4A, ATG4B, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1, GABARAPL1, MAP1LC3A, MFN1, RB1CC1]	5,19E-06
Ciclo de GTPasa RAC2	[CDC42EP4, GIT1, GIT2, NCKAP1L, RAB7A, SWAP70, TAOK3, TMPO]	1,06E-05
Ciclo de GTPasa RAC3	[GIT1, GIT2, NCKAP1L, RAB7A, SWAP70, TAOK3, TMPO]	2,70E-04
Ciclo de GTPasa RAC1	[CDC42EP4, GIT1, GIT2, NCKAP1L, PLEKHG4, RAB7A, SWAP70, TAOK3, TMPO]	3,28E-04
Reconocimiento del daño en el ADN en GG-NER	[ACTB, COPS2, COPS7B, COPS8, GPS1]	4,72E-04
Pérdida de Nlp de los centrosomas mitóticos	[ACTR1A, DCTN1, DCTN3, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1]	6,30E-04
Ciclo de GTPasa CDC42	[ARFGAP2, ARFGAP3, CDC42EP4, GIT1, GIT2, PLEKHG4, RAB7A, TMPO]	7,47E-04
Ciclo de GTPasa RHOF	[ACTB, ACTN1, CAPZB, RAB7A, TMPO]	7,58E-04
Activación de AURKA por TPX2	[ACTR1A, DCTN1, DCTN3, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1]	7,78E-04
Reclutamiento de proteínas y complejos del centrosoma mitótico	[ACTR1A, DCTN1, DCTN3, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1]	1,45E-03
Maduración del centrosoma	[ACTR1A, DCTN1, DCTN3, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1]	1,45E-03
Regulación de la actividad de PLK1 en la transición G2/M	[ACTR1A, DCTN1, DCTN3, DYNC1H1, DYNC1I2, DYNLL1]	2,07E-03
Señalización por interferón gamma	[CAMK2D, GBP2, GBP3, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-F]	2,46E-03

* p_{adj} : significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 20. Rutas Reactome de la comparación EMPP con HC. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMPP y HC**.

Rutas Reactome	Genes asociados encontrados	*FDR
Reparación por escisión de bases defectuosa asociada con MUTYH	[MUTYH]	2,26E-03
Procesamiento defectuoso del sustrato de MUTYH	[MUTYH]	2,26E-03
Enfermedades de la reparación por escisión de bases	[MUTYH]	2,36E-02
Desplazamiento de la ADN glicosilasa por APEX1	[MUTYH]	2,74E-02

*FDR: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado tras corrección por Benjamini-Hochberg para controlar la tasa de descubrimientos falsos

Tabla suplementaria 21. Rutas Reactome de la comparación EMRR con EMSP. Clúster 1. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 1**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR** y pacientes con **EMSP**.

Rutas Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj.}
Formación de un reservorio de subunidades 40S libres	[EIF3H, RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	9,87E-17
Silenciamiento traduccional mediado por L13a de la expresión de ceruloplasmina	[EIF3H, RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	2,80E-16
Hidrólisis de GTP y unión con la subunidad ribosómica 60S	[EIF3H, RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	2,97E-16
Metabolismo de aminoácidos que contienen selenio	[QARS1, RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	5,16E-16
Inicio de la traducción en eucariotas	[EIF3H, RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	5,42E-16
Inicio de la traducción dependiente del cap	[EIF3H, RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	5,42E-16
Elongación de la cadena peptídica	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	2,75E-15
Traducción de ARNm viral	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	2,75E-15
Elongación de la traducción en eucariotas	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	4,14E-15
Síntesis de selenocisteína	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	4,14E-15
Terminación de la traducción en eucariotas	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	4,14E-15
NMD independiente del complejo de unión a exones (EJC)	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	4,90E-15
Respuesta de EIF2AK4 (GCN2) a la deficiencia de aminoácidos	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	8,75E-15
Regulación de la expresión de SLITs y ROBOs	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28, UBC]	2,33E-14
Direccionamiento cotraduccional dependiente de SRP de proteínas a la membrana	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	2,40E-14
Degradación mediada por codones sin sentido (NMD)	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	2,76E-14
NMD potenciado por el complejo de unión a exones (EJC)	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	2,76E-14
Ruta principal del procesamiento de ARNr en el nucleolo y el citosol	[IMP3, RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	4,58E-14
Procesamiento de ARNr en el núcleo y el citosol	[IMP3, RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	7,63E-14

Anexo II

Procesamiento de ARNr	[IMP3, RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	1,00E-13
Traducción	[EIF3H, QARS1, RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	1,11E-13
Transcripción y replicación del ARN viral de la influenza	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	1,13E-13
Señalización por receptores ROBO	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28, UBC]	1,86E-13
Infección por el virus de la influenza	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	3,14E-13
Respuesta celular a la privación de nutrientes	[RPL13A, RPL14, RPL21, RPL23, RPL8, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	3,14E-13
Formación del complejo ternario y, posteriormente, del complejo 43S	[EIF3H, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	1,73E-09
Activación del ARNm mediante unión del complejo de unión al cap y los eIFs, y posterior unión al 43S	[EIF3H, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	2,86E-09
Formación del complejo de inicio de la traducción	[EIF3H, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	3,22E-09
Escaneo ribosómico y reconocimiento del codón de inicio	[EIF3H, RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	3,22E-09
El SARS-CoV-2 modula la maquinaria de traducción del hospedador	[RPS11, RPS19, RPS20, RPS27A, RPS28]	7,37E-08
Señalización de FLT3	[FOXO3, RPS27A, UBC]	8,60E-05
Necrosis regulada	[CYCS, RPS27A, UBC]	1,46E-04

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 22. Rutas Reactome de la comparación EMRR con EMSP. Clúster 2. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 2**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR** y pacientes con **EMSP**

Rutas Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj}
Proteasas del dominio tumor de ovario	[IFIH1, PTEN, TNFAIP3, TNIP1]	8,21E-05
Señalización de interleucina-4 e interleucina-13	[HIF1A, IL1B, IL6, ITGAX, PTGS2]	2,63E-04

Vías de señalización de receptores NLR (dominio de unión a nucleótidos con repeticiones ricas en leucina)	[BIRC3, NLRP3, TNFAIP3]	1,17E-03
Necrosis regulada	[BIRC3, CFLAR, IL1B]	1,17E-03
Señalización de interleucina-10	[IL1B, IL6, PTGS2]	1,33E-03
Reguladores negativos de la señalización de DDX58/IFIH1	[IFIH1, TBK1, TNFAIP3]	1,39E-03
Regulación de la señalización de TNFR1	[BIRC3, CFLAR, TNFAIP3]	1,39E-03
Interacciones de DAP12	[B2M, KRAS, TREM1]	1,76E-03
Señalización de TNF	[BIRC3, CFLAR, TNFAIP3]	2,20E-03

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 23. Rutas Reactome de la comparación EMRR con EMSP. Clúster 3. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 3**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR** y pacientes con **EMSP**.

Rutas Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj} .
Señalización de interleucina-10	[CSF1, CXCL1, CXCL8, IL1R1]	1,13E-06

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 24. Rutas Reactome de la comparación EMRR con EMSP. Clúster 4. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 4**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR** y pacientes con **EMSP**.

Rutas Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj} .
Los aminoácidos regulan mTORC1	[ATP6V0E2, ATP6V1B2, LAMTOR3, SLC38A9, WDR59]	2,74E-12

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 25. Rutas Reactome de la comparación EMRR con EMSP. Clúster 5. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 5**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR** y pacientes con **EMSP**.

Rutas Reactome	Genes asociados encontrados	* p_{adj} .
Biosíntesis de coenzima A	[COASY, PANK4, PPCDC, PPCS]	2,40E-13
Metabolismo de la vitamina B5 (pantotenato)	[COASY, PANK4, PPCDC, PPCS]	4,08E-12

* p_{adj} : significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 26. Rutas Reactome de la comparación EMRR con EMSP. Clúster 6. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 6**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR** y pacientes con **EMSP**.

Rutas Reactome	Genes asociados encontrados	* p_{adj} .
Presentación de antígenos por MHC clase II	[AP1G1, AP1S2, CAPZA1, CAPZA2, SEC31A]	5,18E-06
Señalización por EPH-Efrina	[ACTR3, ADAM10, CDC42, ROCK1]	4,01E-05
Señalización por EGFR	[ADAM10, AREG, CDC42]	7,10E-05
Señalización directa mediada por EPHB	[ACTR3, CDC42, ROCK1]	8,38E-05

* p_{adj} : significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 27. Rutas Reactome de la comparación EMRR con EMPP. Clúster 1. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 1**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR** y pacientes con **EMPP**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj.}
Señalización de interleucina-10	[CCL2, CCL20, CCL3, CCL4, CD80, CD86, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8, ICAM1, IL10RA, IL18, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, PTGS2, TNF]	4,10E-35
Señalización por interleucinas	[CASP1, CCL2, CCL20, CCL3, CCL4, CD80, CD86, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8, HIF1A, ICAM1, IL10RA, IL18, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, ITGAX, MYD88, NFKBIA, NOD2, PTGS2, STAT1, SYK, TNF]	5,56E-27
Señalización de citoquinas en el sistema inmunitario	[CASP1, CCL2, CCL20, CCL3, CCL4, CD44, CD80, CD86, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8, HIF1A, ICAM1, IL10RA, IL18, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IRF1, ITGAX, MYD88, NFKBIA, NOD2, PTGS2, RELB, STAT1, SYK, TNF]	1,45E-26
Señalización de interleucina-4 e interleucina-13	[CCL2, CXCL8, HIF1A, ICAM1, IL18, IL1A, IL1B, IL6, ITGAX, PTGS2, STAT1, TNF]	3,46E-14
Los receptores de quimiocinas se unen a quimiocinas	[CCL2, CCL20, CCL3, CCL4, CCL7, CCRL2, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8]	1,11E-13
Receptores de unión a péptidos ligando	[CCL2, CCL20, CCL3, CCL4, CCL7, CCRL2, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8]	2,71E-08
Procesamiento de interleucina-1	[CASP1, IL18, IL1A, IL1B]	2,53E-07
Señalización purinérgica en la infección por leishmaniasis	[CASP1, IL18, IL1A, IL1B, NLRP3]	3,86E-07
Reclutamiento celular (respuesta proinflamatoria)	[CASP1, IL18, IL1A, IL1B, NLRP3]	3,86E-07
Señalización de la familia de interleucina-1	[CASP1, IL18, IL1A, IL1B, IL1RN, MYD88, NFKBIA, NOD2]	3,88E-07
Piroptosis	[CASP1, IL18, IL1A, IL1B, IRF1]	4,79E-07
Necrosis regulada	[CASP1, IL18, IL1A, IL1B, IRF1]	1,51E-05
Señalización de interleucina-1	[IL1A, IL1B, IL1RN, MYD88, NFKBIA, NOD2]	1,65E-05
Señalización de CLEC7A (Dectin-1)	[CLEC7A, IL1B, NFKBIA, RELB, SYK]	2,22E-04
Cascada del receptor tipo Toll 9 (TLR9)	[MYD88, NFKBIA, NOD2, TLR4]	8,15E-04
Cascada del receptor tipo Toll 7/8 (TLR7/8)	[MYD88, NFKBIA, NOD2, TLR4]	1,08E-03
Enfermedades del sistema inmunitario	[MYD88, NFKBIA, TLR4]	1,16E-03

Anexo II

Enfermedades asociadas con la cascada de señalización TLR	[MYD88, NFKBIA, TLR4]	1,16E-03
Vías de señalización de receptores NLR (dominio de unión a nucleótidos con repeticiones ricas en leucina)	[CASP1, NLRP3, NOD2]	1,17E-03
Cascada dependiente de MyD88 iniciada en endosoma	[MYD88, NFKBIA, NOD2, TLR4]	1,39E-03
Señalización por interferón gamma	[CD44, ICAM1, IRF1, STAT1]	1,66E-03
Inducción mediada por TRAF6 de NFkB y quinasas MAP tras activación de TLR7/8 o 9	[MYD88, NFKBIA, NOD2, TLR4]	1,66E-03

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 28. Rutas Reactome de la comparación EMRR con EMPP. Clúster2. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 2**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR** y pacientes con **EMPP**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj}
Procesamiento del extremo 3' del ARNm	[PAPOLA, SRRM1, SRSF11, SRSF5]	8,24E-06
Terminación de la transcripción por ARN polimerasa II	[PAPOLA, SRRM1, SRSF11, SRSF5]	1,33E-05
Transporte de ARNm maduro derivado de un transcrito que contiene intrones	[SRRM1, SRSF11, SRSF5]	1,08E-04
Regulación de la expresión y actividad de RUNX2	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	2,00E-04
Eliminación de Orc1 de la cromatina	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	2,76E-04
Degradación de p27/p21 mediada por SCF(Skp2)	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	2,78E-04
Señalización no canónica de NF-kB mediada por Dectin-1	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	2,78E-04
Degradación de GLI1 por el proteasoma	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	2,78E-04
Degradación de GLI2 por el proteasoma	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	2,78E-04
GLI3 se procesa a GLI3R por el proteasoma	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	2,78E-04
Degradación de Emi1 mediada por SCF-beta-TrCP	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	2,99E-04

Activación de NF-kappaB en células B	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	3,09E-04
NIK → señalización no canónica de NF-kB	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	3,17E-04
FBXL7 regula negativamente AURKA durante la entrada en mitosis y en la mitosis temprana	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	3,24E-04
Regulación negativa de la señalización de NOTCH4	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	3,24E-04
Degradación de NFE2L2 mediada por GSK3B y BTRC:CUL1	[CUL1, PSMA6, PSMC5]	3,25E-04

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 29. Rutas Reactome de la comparación EMRR con EMPP. Clúster 3. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 3**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR** y pacientes con **EMPP**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj} .
Señalización por interferón gamma	[CIITA, HLA-A, HLA-DRA, OASL]	7,18E-05
Señalización por interferón alfa/beta	[HLA-A, IFIT3, OASL]	4,47E-04

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 30. Rutas Reactome de la comparación EMRR con EMPP. Clúster 4. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 4**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMRR** y pacientes con **EMPP**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj} .
Señalización de la subunidad beta:gamma de la proteína G	[GNB4, GNG5, PIK3R5, PLCB1]	6,16E-06
Función presináptica de los receptores de kainato	[GNB4, GNG5, PLCB1]	7,83E-05

Señalización de G beta:gamma a través de PLC beta	[GNB4, GNG5, PLCB1]	8,06E-05
Señalización de G beta:gamma a través de PI3Kgamma	[GNB4, GNG5, PIK3R5]	1,08E-04
Señalización de opioides	[GNB4, GNG5, GRK2, PLCB1]	1,24E-04
Activación de los receptores de kainato tras la unión de glutamato	[GNB4, GNG5, PLCB1]	1,72E-04
Vía del Ca ²⁺	[GNB4, GNG5, PLCB1]	4,17E-04

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 31. Rutas Reactome de la comparación EMSP con EMPP. Clúster 1. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 1**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y pacientes con **EMPP**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj} .
Silenciamiento traduccional mediado por L13a de la expresión de ceruloplasmina	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF4A1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Elongación de la traducción en eucariotas	[EEF1A1, EEF1B2, EEF1D, EEF2, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Elongación de la cadena peptídica	[EEF1A1, EEF2, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Infección por el virus de la influenza	[ISG15, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Transcripción y replicación del ARN viral de la influenza	[RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Direccionamiento cotraduccional dependiente de SRP de proteínas a la membrana	[RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8, SEC61B]	<1,0E-50

Traducción de ARNm viral	[RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Metabolismo de aminoácidos que contienen selenio	[QARS1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Síntesis de selenocisteína	[RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Señalización por receptores ROBO	[ETF1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8, UBB, UBC]	<1,0E-50
Ruta principal del procesamiento de ARNr en el nucleolo y el citosol	[IMP3, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPP38, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Procesamiento de ARNr	[IMP3, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPP38, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Inicio de la traducción en eucariotas	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF4A1, EIF5B, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Formación de un reservorio de subunidades 40S libres	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Hidrólisis de GTP y unión con la subunidad ribosómica 60S	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF4A1, EIF5B, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Inicio de la traducción dependiente del cap	[EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF4A1, EIF5B, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Terminación de la traducción en eucariotas	[ETF1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Traducción	[EEF1A1, EEF1B2, EEF1D, EEF2, EIF3E, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF4A1, EIF5B, ETF1, GFM1, MRPL16, MRPL3, MRPL4, MRPS11, MRPS14, MRPS5, MTIF2, QARS1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8, SEC61B]	<1,0E-50

Anexo II

Procesamiento de ARNr en el núcleo y el citosol	[IMP3, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPP38, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Regulación de la expresión de SLITs y ROBOs	[ETF1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8, UBB, UBC]	<1,0E-50
Degradación mediada por codones sin sentido (NMD)	[ETF1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Respuesta de EIF2AK4 (GCN2) a la deficiencia de aminoácidos	[RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Respuesta celular a la privación de nutrientes	[RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
NMD independiente del complejo de unión a exones (EJC)	[ETF1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	<1,0E-50
Metabolismo de aminoácidos y derivados	[QARS1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8]	2,24E-44
Metabolismo de ARN	[EFTUD2, EIF4A1, ETF1, IMP3, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPP38, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8, UBB, UBC]	8,78E-41
Guía axonal	[ETF1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8, UBB, UBC]	2,49E-39
Desarrollo del sistema nervioso	[ETF1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8, UBB, UBC]	2,10E-38
Respuesta celular al estrés	[EEF1A1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8, UBB, UBC]	4,46E-32
Respuesta celular a estímulos	[EEF1A1, RPL10, RPL10A, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL3, RPL34, RPL35, RPL36, RPL36A, RPL37A, RPL5, RPL7A, RPL8, RPLP0, RPLP2, RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS15, RPS17, RPS19, RPS2, RPS20, RPS21, RPS24, RPS27, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS7, RPS8, UBB, UBC]	1,01E-31

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 32. Rutas Reactome de la comparación EMSP con EMPP. Clúster 2. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 2**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y pacientes con **EMPP**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj}
Señalización de citoquinas en el sistema inmunitario	[B2M, CCL2, CCL22, CCL3, CCL4, CCR1, CCR2, CD27, CD36, CD4, CD40LG, CD44, CD80, CD86, CREB1, CSF1, CXCL10, CXCL2, CXCL8, FCGR1A, GATA3, HAVCR2, ICAM1, IFNAR1, IFNG, IL10, IL10RA, IL12RB1, IL15, IL18, IL1B, IL1R1, IL1RN, IL3RA, IL6, IL7R, IRAK1, IRF1, IRF3, IRF4, IRF5, ITGAM, ITGAX, ITGB2, JAK1, JAK2, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MMP9, MYD88, NOD2, PSMA3, PSMA7, PSMC5, PSMD2, PTGS2, RELB, SOCS3, STAT1, STAT6, SYK, TBK1, TCP1, TNFRSF1A]	4,18E-36
Señalización por interleucinas	[CCL2, CCL22, CCL3, CCL4, CCR1, CCR2, CD36, CD4, CD80, CD86, CREB1, CSF1, CXCL10, CXCL2, CXCL8, GATA3, HAVCR2, ICAM1, IFNG, IL10, IL10RA, IL12RB1, IL15, IL18, IL1B, IL1R1, IL1RN, IL3RA, IL6, IL7R, IRAK1, IRF4, ITGAM, ITGAX, ITGB2, JAK1, JAK2, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MMP9, MYD88, NOD2, PSMA3, PSMA7, PSMC5, PSMD2, PTGS2, SOCS3, STAT1, STAT6, SYK, TBK1, TCP1, TNFRSF1A]	7,98E-36
Sistema inmunitario	[ATP6V0B, B2M, CASP8, CCL2, CCL22, CCL3, CCL4, CCR1, CCR2, CCR6, CD1B, CD1C, CD27, CD28, CD33, CD36, CD4, CD40LG, CD44, CD47, CD68, CD80, CD86, CD8A, CLEC7A, CREB1, CSF1, CTLA4, CTSS, CXCL10, CXCL2, CXCL8, CYBB, FCGR1A, FCGR2A, FCGR2B, FCGR3B, GATA3, HAVCR2, ICAM1, IFIH1, IFNAR1, IFNG, IL10, IL10RA, IL12RB1, IL15, IL18, IL1B, IL1R1, IL1RN, IL3RA, IL6, IL7R, IRAK1, IRF1, IRF3, IRF4, IRF5, ITGAM, ITGAX, ITGB2, JAK1, JAK2, LAG3, LGALS3, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MMP9, MYD88, NCR1, NLRP3, NOD2, PDCD1, PECAM1, POLR1C, POLR3A, PSMA3, PSMA7, PSMC5, PSMD2, PTGS2, RELB, SIRPA, SOCS3, STAT1, STAT6, SYK, TBK1, TCP1, TLR2, TLR4, TLR7, TNFRSF1A, TYROBP]	7,40E-34
Señalización de interleucina-10	[CCL2, CCL22, CCL3, CCL4, CCR1, CCR2, CD80, CD86, CSF1, CXCL10, CXCL2, CXCL8, ICAM1, IL10, IL10RA, IL18, IL1B, IL1R1, IL1RN, IL6, JAK1, PTGS2, TNFRSF1A]	3,49E-29
Señalización de interleucina-4 e interleucina-13	[CCL2, CCL22, CD36, CXCL8, GATA3, ICAM1, IL10, IL18, IL1B, IL6, IRF4, ITGAM, ITGAX, ITGB2, JAK1, JAK2, MMP9, PTGS2, SOCS3, STAT1, STAT6]	9,78E-17
Sistema inmunitario innato	[ATP6V0B, B2M, CASP8, CCR2, CCR6, CD33, CD36, CD4, CD44, CD47, CD68, CLEC7A, CREB1, CTSS, CYBB, FCGR1A, FCGR2A, FCGR3B, IFIH1, IL1B, IRAK1, IRF3, ITGAM, ITGAX, ITGB2, LGALS3, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MMP9, MYD88, NLRP3, NOD2, PECAM1, POLR1C, POLR3A, PSMA3, PSMA7, PSMC5, PSMD2, RELB, SIRPA, STAT6, SYK, TBK1, TLR2, TLR4, TLR7, TYROBP]	4,52E-13
Los receptores de quimiocinas se unen a quimiocinas	[CCL2, CCL22, CCL3, CCL4, CCR1, CCR2, CCR6, CCRL2, CX3CR1, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CXCL2, CXCL8]	4,69E-12
Cascadas de receptores tipo Toll	[CASP8, CD36, CREB1, CTSS, IRAK1, IRF3, ITGAM, ITGB2, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MYD88, NOD2, TBK1, TLR2, TLR4, TLR7]	5,23E-09
Señalización por interferón gamma	[B2M, CD44, FCGR1A, ICAM1, IFNG, IRF1, IRF3, IRF4, IRF5, JAK1, JAK2, SOCS3, STAT1]	3,70E-08
Cascada del receptor tipo Toll 4 (TLR4)	[CASP8, CD36, CREB1, IRAK1, IRF3, ITGAM, ITGB2, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MYD88, NOD2, TBK1, TLR2, TLR4]	5,52E-08
Procesamiento de antígenos — presentación cruzada	[B2M, CD36, CTSS, CYBB, FCGR1A, MYD88, PSMA3, PSMA7, PSMC5, PSMD2, TLR2, TLR4]	2,52E-06
Sistema inmunitario adaptativo	[B2M, CD1B, CD1C, CD28, CD33, CD36, CD4, CD40LG, CD80, CD86, CD8A, CTLA4, CTSS, CYBB, FCGR1A, FCGR2B, ICAM1, ITGB2, LAG3, MYD88, NCR1, PDCD1, PSMA3, PSMA7, PSMC5, PSMD2, SOCS3, SYK, TLR2, TLR4, TYROBP]	4,36E-06

Anexo II

Señalización de la familia de interleucina-1	[IL18, IL1B, IL1R1, IL1RN, IRAK1, MAPK8, MYD88, NOD2, PSMA3, PSMA7, PSMC5, PSMD2, TBK1]	8,36E-06
Señalización por interferones	[B2M, CD44, FCGR1A, ICAM1, IFNAR1, IFNG, IRF1, IRF3, IRF4, IRF5, JAK1, JAK2, MAPK3, SOCS3, STAT1]	1,13E-05
El SARS-CoV-2 activa/modula respuestas inmunitarias innata y adaptativa	[B2M, IFIH1, IFNAR1, IRAK1, IRF3, JAK1, NLRP3, NOD2, STAT1, TBK1, TLR2, TLR7]	1,92E-05
Señalización de interleucina-6	[IL6, JAK1, JAK2, SOCS3, STAT1]	2,84E-05
Interacciones inmunorreguladoras entre una célula linfóide y una célula no linfóide	[B2M, CD1B, CD1C, CD33, CD40LG, CD8A, FCGR1A, FCGR2B, ICAM1, ITGB2, NCR1, TYROBP]	3,74E-05
Receptores de unión a péptidos ligando	[CCL2, CCL22, CCL3, CCL4, CCR1, CCR2, CCR6, CCRL2, CX3CR1, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CXCL2, CXCL8]	8,13E-05
Regulación de la señalización de IFNG	[IFNG, JAK1, JAK2, SOCS3, STAT1]	1,17E-04
Cascada TLR4 independiente de MyD88	[CASP8, CREB1, IRAK1, IRF3, MAPK14, MAPK3, MAPK8, NOD2, TBK1, TLR4]	1,26E-04
Señalización de TLR4 mediada por TRIF (TICAM1)	[CASP8, CREB1, IRAK1, IRF3, MAPK14, MAPK3, MAPK8, NOD2, TBK1, TLR4]	1,26E-04
Muerte celular programada	[CASP8, CYCS, FAS, IL18, IL1B, IRF1, MAPK3, MAPK8, PSMA3, PSMA7, PSMC5, PSMD2, TLR4, TNFSF10]	1,35E-04
Cascada MyD88:MAL (TIRAP) iniciada en la membrana plasmática	[CD36, CREB1, IRAK1, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MYD88, NOD2, TLR2, TLR4]	1,50E-04
Cascada del receptor tipo Toll TLR6:TLR2	[CD36, CREB1, IRAK1, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MYD88, NOD2, TLR2, TLR4]	1,50E-04
Señalización de interleucina-1	[IL1B, IL1R1, IL1RN, IRAK1, MYD88, NOD2, PSMA3, PSMA7, PSMC5, PSMD2]	1,79E-04
Cascada del receptor tipo Toll TLR1:TLR2	[CD36, CREB1, IRAK1, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MYD88, NOD2, TLR2, TLR4]	1,95E-04
Cascada del receptor tipo Toll 2 (TLR2)	[CD36, CREB1, IRAK1, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MYD88, NOD2, TLR2, TLR4]	1,95E-04
Señalización de la familia de interleucina-2	[HAVCR2, IL15, IL3RA, JAK1, JAK2, STAT1, SYK]	2,64E-04
Degranulación de neutrófilos	[B2M, CD33, CD36, CD44, CD47, CD68, CTSS, CYBB, FCGR2A, FCGR3B, ITGAM, ITGAX, ITGB2, LGALS3, MAPK14, MMP9, PECAM1, PSMD2, SIRPA, TLR2, TYROBP]	2,80E-04
Formación de ATP por acoplamiento quimiosmótico	[ATP5F1A, ATP5F1B, ATP5F1C, ATP5F1D, ATP5MC1]	4,53E-04

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 33, Rutas Reactome de la comparación EMSP con EMPP. Clúster 3. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 3**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y pacientes con **EMPP**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj}
Splicing de ARNm — Vía principal	[ALYREF, CPSF6, DDX5, DHX15, ELAVL1, HNRNPA3, HNRNPH1, HNRNPH2, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, PABPN1, PRPF8, PTBP1, RBMX, SF1, SF3B3, SNRNP70, SNRPA1, SRRM1, SRRT, SRSF1, SRSF10, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF7, TRA2B, U2AF1, U2AF2]	1,02E-18
Splicing de ARNm	[ALYREF, CPSF6, DDX5, DHX15, ELAVL1, HNRNPA3, HNRNPH1, HNRNPH2, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, PABPN1, PRPF8, PTBP1, RBMX, SF1, SF3B3, SNRNP70, SNRPA1, SRRM1, SRRT, SRSF1, SRSF10, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF7, TRA2B, U2AF1, U2AF2]	3,90E-18
Eventos de señalización posteriores al receptor de células B (BCR)	[BTRC, CUL1, IKKB, KRAS, NFATC1, NFKB1, NFKBIA, NFKBIB, NFKBIE, PPIA, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, REL, RELA]	6,95E-18
Señalización por el receptor de células B (BCR)	[BTK, BTRC, CD22, CUL1, IKKB, KRAS, NFATC1, NFKB1, NFKBIA, NFKBIB, NFKBIE, PPIA, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, REL, RELA]	4,76E-17
Regulación de activadores de APC/C entre G1/S y la anafase temprana	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, BTRC, CDC16, CDC23, CUL1, FZR1, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	7,71E-17
Transporte electrónico respiratorio	[COX7B, COX7C, NDUFA11, NDUFA2, NDUFA4, NDUFA5, NDUFA6, NDUFA9, NDUFB10, NDUFB2, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, SDHB, SDHC, SDHD, UQCRC1, UQCRH, UQCRCQ]	8,77E-17
Procesamiento de pre-ARNm con cap y que contiene intrones	[ALYREF, CHTOP, CPSF6, DDX39B, DDX5, DHX15, ELAVL1, HNRNPA3, HNRNPH1, HNRNPH2, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, PABPN1, PRPF8, PTBP1, RBMX, SF1, SF3B3, SNRNP70, SNRPA1, SRRM1, SRRT, SRSF1, SRSF10, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF7, TRA2B, U2AF1, U2AF2]	9,08E-17
Autodegradación de Cdh1 por Cdh1:APC/C	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, CDC16, CDC23, FZR1, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	1,52E-16
Activación de NF-kappaB en células B	[BTRC, CUL1, IKKB, NFKB1, NFKBIA, NFKBIB, NFKBIE, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, REL, RELA]	4,24E-16
Degradación mediada por APC/C de proteínas del ciclo celular	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, BTRC, CDC16, CDC23, CUL1, FZR1, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	5,44E-16
Regulación del ciclo celular mitótico	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, BTRC, CDC16, CDC23, CUL1, FZR1, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	5,44E-16
Degradación mediada por APC/C de proteínas del ciclo celular	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, BTRC, CDC16, CDC23, CUL1, FZR1, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	5,44E-16
Regulación del ciclo celular mitótico	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, BTRC, CDC16, CDC23, CUL1, FZR1, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	5,44E-16

Anexo II

Señalización de citoquinas en el sistema inmunitario	[AKT1, APP, BCL6, BTRC, CCL3L1, CCND1, CDKN1A, CUL1, EIF2AK2, FOXO3, HGF, HIF1A, HLA-A, HNRNPDL, IFNAR2, IFNGR1, IKBKB, IL1R2, IL23A, IRF8, IRF9, KRAS, LCK, LCN2, LGALS9, LTB, MAP3K14, MAPK9, MCL1, MMP1, MYC, NFKB1, NFKBIA, NFKBIB, NOD1, PPIA, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, RELA, SNRPA1, SOD2, STAT2, STAT4, TIMP1, UBE2D1, UBE2E1]	5,95E-16
Señalización por interleucinas	[AKT1, APP, BCL6, BTRC, CCL3L1, CCND1, CDKN1A, CUL1, FOXO3, HGF, HIF1A, HNRNPDL, IKBKB, IL1R2, IL23A, LCK, LCN2, LGALS9, MAPK9, MCL1, MMP1, MYC, NFKB1, NFKBIA, NFKBIB, NOD1, PPIA, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, RELA, SNRPA1, SOD2, STAT2, STAT4, TIMP1]	9,88E-16
Transporte electrónico respiratorio, síntesis de ATP por acoplamiento quimiosmótico y producción de calor por proteínas desacoplates	[ATP5PD, COX7B, COX7C, NDUFA11, NDUFA2, NDUFA4, NDUFA5, NDUFA6, NDUFA9, NDUFB10, NDUFB2, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, SDHB, SDHC, SDHD, UQCRC1, UQCRH, UQCRQ]	1,18E-15
Fosforilación mediada por CDK y eliminación de Cdc6	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, CDC16, CDC23, FZR1, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	2,77E-15
Degradación de Securina mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, CDC16, CDC23, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	1,23E-14
Cambio de los orígenes a un estado posreplicativo	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, CDC16, CDC23, CUL1, FZR1, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	2,46E-14
Degradación de la ciclina A mediada por Cdc20:fosfo-APC/C	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, CDC16, CDC23, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	5,29E-14
Fase S	[AKT1, ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, CCND1, CDC16, CDC23, CDKN1A, CUL1, FZR1, MYC, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, RBBP4, UBE2D1, UBE2E1]	5,56E-14
Degradación mediada por APC:Cdc20 de proteínas del ciclo celular antes de la activación del punto de control	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, CDC16, CDC23, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	6,93E-14
Señalización aguas abajo del receptor de células T (TCR)	[BTRC, CD3E, CUL1, IKBKB, LCK, NFKB1, NFKBIA, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, PTEN, RELA, UBE2D1]	9,65E-14
Degradación de proteínas mitóticas mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, CDC16, CDC23, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	1,18E-13
Activación de APC/C y degradación de proteínas mitóticas mediada por APC/C:Cdc20	[ANAPC10, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, CDC16, CDC23, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, UBE2D1, UBE2E1]	1,54E-13
Señalización de interleucina-1	[APP, BTRC, CUL1, IKBKB, IL1R2, NFKB1, NFKBIA, NFKBIB, NOD1, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, RELA]	2,80E-13
Activación de NF-κB mediada por FCER1	[BTRC, CUL1, FCER1G, IKBKB, NFKB1, NFKBIA, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, RELA, UBE2D1]	5,42E-13
Metabolismo de ARN	[AKT1, ALYREF, CHTOP, CPSF6, DDX39B, DDX5, DHX15, ELAVL1, ERI1, HNRNPA3, HNRNPH1, HNRNPH2, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, KHSRP, NOP2, PABPN1, PRPF8, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, PTBP1, RBMX, SF1, SF3B3, SNRNP70, SNRPA1, SRRM1, SRRT, SRSF1, SRSF10, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF7, TRA2B, U2AF1, U2AF2]	5,74E-13

Señalización del receptor de células T (TCR)	[BTRC, CD3E, CUL1, IKBKB, LCK, NFKB1, NFKBIA, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, PTEN, RELA, UBE2D1, ZAP70]	5,97E-13
Señalización del receptor Fc épsilon (FCERI)	[BTK, BTRC, CUL1, FCER1G, IKBKB, KRAS, MAPK9, NFATC1, NFKB1, NFKBIA, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC3, PSMC6, PSMD13, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, RELA, UBE2D1]	6,05E-13

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 34. Rutas Reactome de la comparación EMSP con EMPP. Clúster 4. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 4**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y pacientes con **EMPP**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj}
Expresión génica (transcripción)	[AAAS, ABL1, AFF4, AKT2, ARID4B, ATF2, AXIN1, BAX, BAZ1B, BMP2, CALM1, CAMK2D, CAMK2G, CASC3, CBX3, CBX8, CCNH, CCNK, CCNT2, CDK1, CHD3, CPSF1, CREBBP, CTR9, DDX39A, DEK, DNMT1, EAF1, EAF2, EHMT1, EHMT2, ELL2, ELOC, ERCC3, ERCC6, ESR2, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H4, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, HDAC10, HDAC3, HDAC5, HDAC7, HDAC8, HDAC9, ICE2, ITCH, ITGA2B, JAG1, KAT2A, KAT5, KMT2A, MBD3, MDM2, MED15, MED24, MED25, MED27, MED30, MED6, MEN1, MET, MTA1, MTA2, MTA3, NCOR1, NELFA, NELFCD, NELFE, NOTCH4, NR4A1, NUP188, NUP42, NUP43, NUP50, NUP54, NUP58, NUP62, NUP85, NUP98, PHC1, PHC3, PML, POLDIP3, POLR1D, POLR1G, POLR1H, PPARG, PRKACA, PRMT1, RARG, RRP8, RXRA, SAP30L, SEC13, SEH1L, SIN3A, SIN3B, SLU7, SMARCA5, SRC, SRSF11, SUV39H1, TAF13, TAF4, TAF5, TAF6, TAF9, TBL1X, THBS1, TNFRSF10B, TRIM28, TTF1, U2AF1L4, YWHAB, ZC3H8]	3,80E-36
Enfermedad	[AAAS, ABL1, ADAM17, AGGF1, AGK, AGTRAP, AKAP9, AKT2, AP3B1, ARAF, AREG, ARID4B, ATG7, ATRX, AXIN1, BCL2A1, BRD4, CALM1, CALR, CAMK2D, CAMK2G, CCNH, CCNK, CCNT2, CD8B, CD9, CHD3, CLCN6, CREBBP, DNMT1, DVL1, ELOC, ERCC3, ESR2, FAM114A2, FLT3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H4, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, HDAC10, HDAC3, HDAC5, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HLA-B, HRAS, IMPDH2, IRAK2, ITGA2B, JAG1, KAT2A, KAT5, KDM7A, KEAP1, KSR1, LYN, MAP2K2, MBD3, MDM2, MET, MPRIIP, MTA1, MTA2, MTA3, NCOR1, NELFA, NELFCD, NELFE, NFKB2, NOTCH4, NR4A1, NRAS, NUP188, NUP42, NUP43, NUP50, NUP54, NUP58, NUP62, NUP85, NUP98, P2RY11, PAPSS1, PDGFRA, PHF21A, PML, PRKACA, PRMT1, PTGER4, PTK2, QKI, RIPK2, S100A9, SAP30L, SEC13, SEH1L, SIN3A, SLC2A1, SPRED1, SPRED2, SRC, STAT3, TAB1, TAB2, TAF13, TAF4, TAF5, TAF6, TAF9, TBL1X, TENT4A, TGFB1, TGFB2, THBS1, TNKS, TRADD, TRAF3, TRAK1, TRIM28, UBE2N, WNT5A, YWHAB]	2,03E-32
Regulación epigenética de la expresión génica	[ARID4B, BAZ1B, CBX3, CCNH, CHD3, DEK, DNMT1, EHMT2, ERCC3, ERCC6, GTF2H1, GTF2H4, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, KAT2A, MBD3, MTA1, MTA2, MTA3, POLR1D, POLR1G, POLR1H, RRP8, SAP30L, SIN3A, SIN3B, SMARCA5, SUV39H1, TTF1]	7,04E-26
Transcripción por ARN polimerasa II	[ABL1, AFF4, AKT2, ATF2, AXIN1, BAX, BMP2, CALM1, CAMK2D, CAMK2G, CASC3, CBX3, CBX8, CCNH, CCNK, CCNT2, CDK1, CHD3, CPSF1, CREBBP, CTR9, DDX39A, DEK, EAF1, EAF2, EHMT1, EHMT2, ELL2, ELOC, ERCC3, ESR2, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H4, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, HDAC10, HDAC3, HDAC5, HDAC7, HDAC8, HDAC9, ICE2, ITCH, ITGA2B, JAG1, KAT2A, KAT5, KMT2A, MBD3, MDM2, MED15, MED24, MED25, MED27, MED30, MED6, MEN1, MET, MTA2, NCOR1, NELFA, NELFCD, NELFE, NOTCH4, NR4A1, PHC1, PHC3, PML, POLDIP3, PPARG, PRKACA, PRMT1, RARG, RXRA, SIN3A, SIN3B, SLU7, SRC, SRSF11, TAF13, TAF4, TAF5, TAF6, TAF9, TBL1X, THBS1, TNFRSF10B, TRIM28, U2AF1L4, YWHAB, ZC3H8]	1,84E-22

Anexo II

Señalización por fusiones de BRAF y RAF1	[AGGF1, AGK, AGTRAP, AKAP9, AP3B1, ARAF, ATG7, CALM1, CAMK2D, CAMK2G, CLCN6, FAM114A2, HRAS, ITGA2B, KDM7A, KSR1, MAP2K2, MPRIP, NRAS, PAPSS1, QKI, SRC, TENT4A, TRAK1, YWHAB]	2,79E-20
Señalización oncogénica de MAPK	[AGGF1, AGK, AGTRAP, AKAP9, AP3B1, ARAF, ATG7, CALM1, CAMK2D, CAMK2G, CLCN6, FAM114A2, HRAS, ITGA2B, KDM7A, KSR1, MAP2K2, MPRIP, NRAS, PAPSS1, QKI, SPRED1, SPRED2, SRC, TENT4A, TRAK1, YWHAB]	5,12E-20
Enfermedades de la transducción de señales por receptores de factores de crecimiento y segundos mensajeros	[ADAM17, AGGF1, AGK, AGTRAP, AKAP9, AKT2, AP3B1, ARAF, AREG, ATG7, AXIN1, BCL2A1, CALM1, CAMK2D, CAMK2G, CLCN6, CREBBP, ESR2, FAM114A2, FLT3, HDAC10, HDAC3, HDAC5, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HRAS, ITGA2B, JAG1, KAT2A, KDM7A, KSR1, LYN, MAP2K2, MDM2, MET, MPRIP, NCOR1, NR4A1, NRAS, PAPSS1, PDGFRA, QKI, SPRED1, SPRED2, SRC, STAT3, TBL1X, TENT4A, TGFB1, TGFB2, TNKS, TRAK1, YWHAB]	9,95E-20
Liberación del promotor por ARN polimerasa I	[CBX3, CCNH, CHD3, EHMT2, ERCC3, ERCC6, GTF2H1, GTF2H4, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, KAT2A, MBD3, MTA1, MTA2, MTA3, POLR1D, POLR1G, POLR1H, TTF1]	6,90E-19
Enfermedad infecciosa	[AAAS, ABL1, ADAM17, AKT2, ARID4B, BRD4, CALM1, CALR, CCNH, CCNK, CCNT2, CD8B, CD9, CHD3, CREBBP, DVL1, ELOC, ERCC3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H4, H2AC18, H2AC8, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3C10, H4-16, H4C8, HDAC3, HLA-B, IMPDH2, IRAK2, KEAP1, LYN, MAP2K2, MBD3, MET, MTA1, MTA2, MTA3, NCOR1, NELFA, NELFCD, NELFE, NFKB2, NUP188, NUP42, NUP43, NUP50, NUP54, NUP58, NUP62, NUP85, NUP98, P2RY11, PHF21A, PML, PRKACA, PRMT1, PTGER4, PTK2, RIPK2, SAP30L, SEC13, SEH1L, SRC, TAB1, TAB2, TAF13, TAF4, TAF5, TAF6, TAF9, TBL1X, TRAF3, TRIM28, UBE2N, WNT5A, YWHAB]	9,73E-19
Transcripción por ARN polimerasa I	[CBX3, CCNH, CHD3, EHMT2, ERCC3, ERCC6, GTF2H1, GTF2H4, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, KAT2A, MBD3, MTA1, MTA2, MTA3, POLR1D, POLR1G, POLR1H, TTF1]	1,20E-18
Regulación epigenética positiva de la expresión de ARNr	[BAZ1B, CBX3, CHD3, DEK, EHMT2, ERCC6, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, KAT2A, MBD3, MTA1, MTA2, MTA3, POLR1D, POLR1G, POLR1H, SMARCA5, TTF1]	3,28E-18
Regulación epigenética negativa de la expresión de ARNr	[ARID4B, CCNH, DNMT1, ERCC3, GTF2H1, GTF2H4, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, POLR1D, POLR1G, POLR1H, RRP8, SAP30L, SIN3A, SIN3B, SMARCA5, SUV39H1, TTF1]	9,83E-18
Enzimas modificadoras de la cromatina	[ARID4B, ATF2, CHD3, CREBBP, DOT1L, EHMT1, EHMT2, ELP2, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3C10, H4-16, H4C8, HDAC10, HDAC3, HDAC8, KAT2A, KAT5, KDM7A, KMT2A, MBD3, MTA1, MTA2, MTA3, NCOR1, NFKB2, PHF21A, PHF8, PRMT1, SAP30L, SUV39H1, TAF9, TBL1X, TRRAP]	1,58E-16
Organización de la cromatina	[ARID4B, ATF2, CHD3, CREBBP, DOT1L, EHMT1, EHMT2, ELP2, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3C10, H4-16, H4C8, HDAC10, HDAC3, HDAC8, KAT2A, KAT5, KDM7A, KMT2A, MBD3, MTA1, MTA2, MTA3, NCOR1, NFKB2, PHF21A, PHF8, PRMT1, SAP30L, SUV39H1, TAF9, TBL1X, TRRAP]	1,58E-16
Fase tardía del ciclo de vida del VIH	[AAAS, CCNH, CCNK, CCNT2, ELOC, ERCC3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H4, NELFA, NELFCD, NELFE, NUP188, NUP42, NUP43, NUP50, NUP54, NUP58, NUP62, NUP85, NUP98, SEC13, SEH1L, TAF13, TAF4, TAF5, TAF6, TAF9]	4,02E-16
Vía general de transcripción	[ABL1, AKT2, ATF2, AXIN1, BAX, BMP2, CALM1, CAMK2D, CAMK2G, CBX3, CBX8, CCNH, CCNK, CCNT2, CDK1, CHD3, CREBBP, DEK, EHMT1, EHMT2, ELOC, ERCC3, ESR2, GTF2H1, GTF2H4, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, HDAC10, HDAC3, HDAC5, HDAC7, HDAC8, HDAC9, ITCH, ITGA2B, JAG1, KAT2A, KAT5, KMT2A, MBD3, MDM2, MED15, MED24, MED25, MED27, MED30, MED6, MEN1, MET, MTA2, NCOR1, NELFA, NELFCD, NELFE, NOTCH4, NR4A1, PHC1, PHC3, PML, PPARD, PRKACA, PRMT1, RARG, RXRA, SIN3A, SIN3B, SRC, TAF13, TAF4, TAF5, TAF6, TAF9, TBL1X, THBS1, TNFRSF10B, TRIM28, YWHAB]	4,68E-16
NoRC regula negativamente la expresión de ARNr	[ARID4B, CCNH, DNMT1, ERCC3, GTF2H1, GTF2H4, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, POLR1D, POLR1G, POLR1H, SAP30L, SIN3A, SIN3B, SMARCA5, TTF1]	8,20E-16
Ciclo de vida del VIH	[AAAS, CCNH, CCNK, CCNT2, ELOC, ERCC3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H4, NELFA, NELFCD, NELFE, NUP188, NUP42, NUP43, NUP50, NUP54, NUP58, NUP62, NUP85, NUP98, SEC13, SEH1L, TAF13, TAF4, TAF5, TAF6, TAF9]	5,62E-15

ERCC6 (CSB) y EHMT2 (G9a) regulan positivamente la expresión de ARNr	[CBX3, CHD3, EHMT2, ERCC6, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, MBD3, MTA1, MTA2, MTA3, TTF1]	9,69E-14
Regulación transcripcional por pequeños ARN	[AAAS, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, NUP188, NUP42, NUP43, NUP50, NUP54, NUP58, NUP62, NUP85, NUP98, SEC13, SEH1L]	9,99E-14
Profase mitótica	[AAAS, CDK1, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, NUP188, NUP42, NUP43, NUP50, NUP54, NUP58, NUP62, NUP85, NUP98, PHF8, PRKCA, SEC13, SEH1L]	1,42E-13
Las ligasas SUMO E3 SUMOilizan proteínas diana	[AAAS, CBX8, CHD3, CREBBP, DNMT1, H4-16, H4C8, HDAC7, HNRNPC, MDM2, MTA1, NFKB2, NUP188, NUP42, NUP43, NUP50, NUP54, NUP58, NUP62, NUP85, NUP98, PHC1, PHC3, PML, RXRA, SEC13, SEH1L, SIN3A, TP53BP1, TRIM28]	1,86E-13
Eventos tempranos del HCMV	[AAAS, H2AC18, H2AC8, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3C10, H4-16, H4C8, HDAC3, NCOR1, NUP188, NUP42, NUP43, NUP50, NUP54, NUP58, NUP62, NUP85, NUP98, PML, SEC13, SEH1L, TBL1X, TRIM28]	3,68E-13
Eventos de pretranscripción de ARN polimerasa II	[AFF4, CCNH, CCNK, CCNT2, CTR9, EAF1, EAF2, ELOC, ERCC3, GTF2A1, GTF2A2, GTF2H1, GTF2H4, NELFA, NELFCD, NELFE, TAF13, TAF4, TAF5, TAF6, TAF9]	3,98E-13
SUMOilación	[AAAS, CBX8, CHD3, CREBBP, DNMT1, H4-16, H4C8, HDAC7, HNRNPC, MDM2, MTA1, NFKB2, NUP188, NUP42, NUP43, NUP50, NUP54, NUP58, NUP62, NUP85, NUP98, PHC1, PHC3, PML, RXRA, SEC13, SEH1L, SIN3A, TP53BP1, TRIM28]	4,62E-13
Las HDAC desacetilan histonas	[ARID4B, CHD3, H2AC18, H2AC8, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3C10, H4-16, H4C8, HDAC10, HDAC3, HDAC8, MBD3, MTA1, MTA2, MTA3, NCOR1, PHF21A, SAP30L, TBL1X]	8,47E-13
Transducción de señales	[AAAS, ABL1, ADAM17, AKT2, ANGPT1, ANXA1, ARAF, AREG, ATF2, AXIN1, AXIN2, BAX, BIRC2, BMP2, CALM1, CAMK2D, CAMK2G, CBX8, CCL4L2, CCNK, CCNT2, CDK1, CHD1, CHD3, CREBBP, CSNK1E, CYLD, DVL1, ESR2, F3, FLT1, FLT3, FOSL1, FPR1, FPR2, GTF2A1, GTF2A2, H2AC18, H2AC8, H2AJ, H2AX, H2BC11, H2BC15, H2BC4, H2BC9, H3-3B, H3C10, H4-16, H4C8, HDAC10, HDAC3, HDAC5, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HNRNPA1, HNRNPC, HRAS, HSPB1, ITCH, ITGA2B, JAG1, KAT2A, KAT5, KLHL12, KSR1, LRRK2, LYN, MAP2K2, MBD3, MDM2, MEN1, MET, MTA1, MTA2, MTA3, NCOR1, NOTCH4, NR4A1, NRAS, NUMB, NUP43, NUP85, NUP98, P2RY1, P2RY11, PDGFRA, PHC1, PHC3, PML, PPARD, PPP1R15A, PRKACA, PRKCA, PRMT1, PTGER4, PTK2, RARG, RIPK2, RNF146, RXRA, S100A9, SEC13, SEH1L, SIN3A, SNAI1, SPOPL, SPRED1, SPRED2, SRC, STAT3, TAB1, TAB2, TBL1X, TGFBR1, TGFBR2, THBS1, TNF, TNFRSF10B, TNKS, TRADD, TRAF1, TRAK1, TRRAP, WNT5A, XCR1, YBX1, YWHAB]	1,48E-12
Inicio de la transcripción por ARN polimerasa I	[CCNH, CHD3, EHMT2, ERCC3, ERCC6, GTF2H1, GTF2H4, KAT2A, MBD3, MTA1, MTA2, MTA3, POLR1D, POLR1G, POLR1H, TTF1]	9,25E-12
SUMOilación de proteínas de unión a ARN	[AAAS, CBX8, HNRNPC, NUP188, NUP42, NUP43, NUP50, NUP54, NUP58, NUP62, NUP85, NUP98, PHC1, PHC3, SEC13, SEH1L]	9,25E-12
Inicio de la transcripción por ARN polimerasa I	[CCNH, CHD3, EHMT2, ERCC3, ERCC6, GTF2H1, GTF2H4, KAT2A, MBD3, MTA1, MTA2, MTA3, POLR1D, POLR1G, POLR1H, TTF1]	9,25E-12

*p_{adj}: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 35. Rutas Reactome de la comparación EMSP con EMPP. Clúster 5. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 5**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y pacientes con **EMPP**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p _{adj}
Reconocimiento de carga para la endocitosis mediada por clatrina	[AAK1, AGFG1, AP2A2, AP2M1, CLTCL1, COPS4, COPS6, COPS7B, EPS15L1, EREG, FCHO1, FCHO2, FZD4, GPS1, HGS, ITSN1, ITSN2, LDLR, LDLRAP1, NECAP1, PICALM, REPS1, REPS2, SGIP1, SH3GL1, SH3KBP1, TGOLN2, VAMP3, VAMP4, VAMP7]	3,68E-17
Los aminoácidos regulan mTORC1	[ATP6V0D1, ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1E2, ATP6V1F, ATP6V1G2, ATP6V1H, CASTOR1, DEPDC5, FLCN, FNIP1, FNIP2, ITFG2, LAMTOR4, LAMTOR5, MIOS, MLST8, NPRL2, SZT2, TCIRG1, WDR24, WDR59]	6,75E-16
Endocitosis mediada por clatrina	[AAK1, AGFG1, AP2A2, AP2M1, CLTCL1, COPS4, COPS6, COPS7B, CTTN, EPS15L1, EREG, FCHO1, FCHO2, FZD4, GAK, GPS1, HGS, ITSN1, ITSN2, LDLR, LDLRAP1, NECAP1, PICALM, RAB5C, REPS1, REPS2, SGIP1, SH3GL1, SH3KBP1, TGOLN2, VAMP3, VAMP4, VAMP7]	9,89E-16
Brotación de vesículas en la red trans-Golgi	[AP1G1, AP1S2, AP1S3, AP3S1, BLOC1S1, BLOC1S3, BLOC1S4, BLOC1S6, CLINT1, FTH1, FTL, GAK, HGS, NECAP1, PICALM, PUM1, RAB5C, SNAP23, SNX2, SNX5, STX4, TGOLN2, TXNDC5, VAMP7]	2,71E-15
Biogénesis de vesículas asociadas al Golgi	[AP1G1, AP1S2, AP1S3, AP3S1, BLOC1S1, BLOC1S3, BLOC1S4, BLOC1S6, CLINT1, FTH1, FTL, GAK, NECAP1, PICALM, PUM1, RAB5C, SNX2, SNX5, TGOLN2, TXNDC5, VAMP7]	1,99E-14
Tráfico de membranas	[AAK1, AGFG1, AKT3, AP1G1, AP1S2, AP1S3, AP2A2, AP2M1, AP3S1, BLOC1S1, BLOC1S3, BLOC1S4, BLOC1S6, CALM3, CLINT1, CLTCL1, COPS4, COPS6, COPS7B, CTTN, EPS15L1, EREG, FCHO1, FCHO2, FTH1, FTL, FZD4, GAK, GOSR1, GPS1, HGS, ITSN1, ITSN2, LDLR, LDLRAP1, NAPB, NAPG, NECAP1, OPTN, PICALM, PUM1, RAB5C, RAB7A, REPS1, REPS2, SEC22B, SERPINA1, SGIP1, SH3GL1, SH3KBP1, SNAP23, SNX2, SNX5, STX10, STX18, STX4, STX5, STX6, TGOLN2, TSC2, TXNDC5, ULK1, VAMP3, VAMP4, VAMP7, VTI1A, YKT6]	2,69E-14
Transporte mediado por vesículas	[AAK1, AGFG1, AKT3, AP1G1, AP1S2, AP1S3, AP2A2, AP2M1, AP3S1, BLOC1S1, BLOC1S3, BLOC1S4, BLOC1S6, CALM3, CLINT1, CLTCL1, COPS4, COPS6, COPS7B, CTTN, EPS15L1, EREG, FCHO1, FCHO2, FTH1, FTL, FZD4, GAK, GOSR1, GPS1, HGS, HSP90AA1, ITSN1, ITSN2, LDLR, LDLRAP1, NAPB, NAPG, NECAP1, OPTN, PICALM, PUM1, RAB5C, RAB7A, REPS1, REPS2, SEC22B, SERPINA1, SGIP1, SH3GL1, SH3KBP1, SNAP23, SNX2, SNX5, SPARC, STX10, STX18, STX4, STX5, STX6, TGOLN2, TSC2, TXNDC5, ULK1, VAMP3, VAMP4, VAMP7, VTI1A, YKT6]	4,23E-14
Sistema inmunitario	[ABI2, AKT3, ALOX5, ANPEP, AP1G1, AP1S2, AP1S3, AP2A2, AP2M1, ATP6V0D1, ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1E2, ATP6V1F, ATP6V1G2, ATP6V1H, BIRC3, BTBD1, CALM3, CD300C, CD53, CD79B, CD93, CD96, CDC42, CLEC10A, CLEC12A, CLEC4A, CLEC4E, CLEC6A, CTS1, CYFIP1, DIAPH1, FBXW7, FTH1, FTL, FYB1, GBP1, GNLY, GSDMD, GSTO1, HCK, HLA-C, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, HSP90AA1, IFI16, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IFNGR2, IL13RA1, IL32, IRS1, JAK3, KBTBD6, KBTBD8, KCTD7, KLHL2, KLHL21, KLHL22, KLHL25, KLHL3, KLHL5, LCP2, LILRB4, LY86, MAP3K8, MAPKAPK2, MAPKAPK3, MLST8, MX2, MYO9B, NCF1, NCF2, NCKAP1L, NF2, NLRC5, NLRP1, OAS3, PLCG2, POLR2H, POLR2K, POU2F1, PPP2R1A, PSMA1, PSMA6, PSMD12, PTPN1, PTPN6, PVR, RAB5C, RAB7A, RAC2, RAF1, RICTOR, RORC, RPS6KA1, S100A8, SEC22B, SERPINA1, SH3KBP1, SKP1, SLAMF6, SLAMF7, SNAP23, SP100, STK10, STOM, STUB1, STX4, TALDO1, TCIRG1, TNFAIP6, TNFRSF13B, TNFRSF14, TNFSF8, TRIM21, TRIM22, TXNDC5, UBE2V1, VAMP3, VAMP7, VAV1, VIM, XAF1, ZBTB16]	1,19E-10
Señalización por receptores tirosina quinasa	[ABI2, ADORA2A, AKT3, AP2A2, AP2M1, ATP6V0D1, ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1E2, ATP6V1F, ATP6V1G2, ATP6V1H, CALM3, CDC42, CYFIP1, DIAPH1, EPS15L1, EREG, FLT4, HDAC1, HGS, HSP90AA1, IRS1, ITGB3, JAK3, MAPKAPK2, MAPKAPK3, MLST8, NCF1, NCF2, NCKAP1L, NRG1, NRP1, POLR2A, POLR2H, POLR2K, PPP2R1A, PTPN1, PTPN6, PXN, RICTOR, RPS6KA1, SH3GL1, SH3KBP1, SPARC, SPHK1, STUB1, TCIRG1, VAV1]	4,46E-08
Enzimas modificadoras de la cromatina	[ATXN7, BRD8, BRMS1, EPC1, EZH2, GPS2, H2AC13, H2AC20, H2AC6, H2AZ1, H2BC12, H2BC18, H2BC21, HDAC1, KDM1B, KDM4C, KMT2B, MCRS1, MSL1, MSL3, NCOA1, NCOR2, NSD2, OGT, PHF20, RBBP5, SETD1B, SETD2, SETD7, SETDB1, TADA3, VPS72]	5,05E-07

Organización de la cromatina	[ATXN7, BRD8, BRMS1, EPC1, EZH2, GPS2, H2AC13, H2AC20, H2AC6, H2AZ1, H2BC12, H2BC18, H2BC21, HDAC1, KDM1B, KDM4C, KMT2B, MCRS1, MSL1, MSL3, NCOA1, NCOR2, NSD2, OGT, PHF20, RBBP5, SETD1B, SETD2, SETD7, SETDB1, TADA3, VPS72]	5,05E-07
Sistema inmunitario adaptativo	[AKT3, AP1G1, AP1S2, AP1S3, AP2A2, AP2M1, BTBD1, CALM3, CD300C, CD79B, CD96, CDC42, CTSL, FBXW7, FYB1, HLA-C, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, IFITM1, KBTBD6, KBTBD8, KCTD7, KLHL2, KLHL21, KLHL22, KLHL25, KLHL3, KLHL5, LCP2, LILRB4, MAP3K8, MLST8, NCF1, NCF2, PLCG2, PPP2R1A, PSMA1, PSMA6, PSMD12, PTPN6, PVR, RAB7A, RAF1, RICTOR, S100A8, SEC22B, SH3KBP1, SKP1, SLAMF6, SLAMF7, SNAP23, STUB1, STX4, TNFRSF14, TRIM21, UBE2V1, VAMP3, VAV1, ZBTB16]	6,92E-07
Ciclo de GTPasa RAC3	[ABI2, BCR, CDC42, CYFIP1, GIT1, GIT2, IL32, NCF1, NCF2, NCKAP1L, PAK4, RAB7A, SNAP23, SWAP70, TAOK3, TMPO, VAMP3, YKT6]	1,00E-06
Ciclo de GTPasa RHO	[ABI2, BCR, CDC42, COPS4, CYFIP1, DIAPH1, FLOT1, GIT1, GIT2, GPS1, HGS, HSP90AA1, IL32, ITS1, ITS2, MYO9B, NCF1, NCF2, NCKAP1L, PAK4, PICALM, PKN1, PKN2, PLEKHG4, RAB7A, RAC2, RHOB, RNF20, SLK, SNAP23, SOWAHC, STK10, STOM, STX5, SWAP70, TAOK3, TJP2, TMPO, VAMP3, VAV1, VIM, YKT6]	1,25E-06
Nedilación	[BTBD1, COPS4, COPS6, COPS7B, DCAF11, DCAF13, DCAF5, DCAF6, DCAF8, DDA1, FBXW7, GPS1, KBTBD6, KBTBD8, KCTD7, KLHL2, KLHL21, KLHL22, KLHL25, KLHL3, KLHL5, NUB1, PSMA1, PSMA6, PSMD12, RBBP5, SENP8, SKP1, ZBTB16]	1,40E-06
Señalización por VEGF	[ABI2, AKT3, CALM3, CDC42, CYFIP1, FLT4, HSP90AA1, ITGB3, MAPKAPK2, MAPKAPK3, MLST8, NCF1, NCF2, NCKAP1L, NRP1, PXN, RICTOR, SPHK1, VAV1]	1,59E-06
Ciclo de GTPasa RAC2	[ABI2, BCR, CDC42, CYFIP1, GIT1, GIT2, NCF1, NCF2, NCKAP1L, PAK4, RAB7A, RAC2, SWAP70, TAOK3, TMPO, VAMP3, VAV1]	2,40E-06
Respuesta celular a la privación de nutrientes	[ATP6V0D1, ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1E2, ATP6V1F, ATP6V1G2, ATP6V1H, CASTOR1, DEPDC5, FLCN, FNIP1, FNIP2, ITFG2, LAMTOR4, LAMTOR5, MIOS, MLST8, NPRL2, SZT2, TCIRG1, WDR24, WDR59]	6,75E-06
Producción de ROS y RNS en fagocitos	[ATP6V0D1, ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1E2, ATP6V1F, ATP6V1G2, ATP6V1H, NCF1, NCF2, RAC2, TCIRG1]	7,38E-06
Señalización por GTPasas Rho	[ABI2, BCR, CALM3, CDC42, COPS4, CTTN, CYFIP1, DIAPH1, FLOT1, GIT1, GIT2, GPS1, H2AC20, H2AC6, H2AZ1, H2BC12, H2BC21, H3-3A, HGS, HSP90AA1, IL32, ITS1, ITS2, KDM4C, MYO9B, NCF1, NCF2, NCKAP1L, NF2, PAK4, PICALM, PKN1, PKN2, PLEKHG4, PPP2R1A, RAB7A, RAC2, RHOB, RNF20, S100A8, SLK, SNAP23, SOWAHC, STK10, STOM, STX5, SWAP70, TAOK3, TJP2, TMPO, VAMP3, VAV1, VIM, YKT6]	9,73E-06
Transducción de señales	[AATF, ABCA1, ABI2, ADORA2A, AKT3, ALDH1A1, AP2A2, AP2M1, ATP6V0D1, ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1E2, ATP6V1F, ATP6V1G2, ATP6V1H, BCL9L, BCR, BIRC3, CALM3, CCND3, CDC42, CDC73, CDKN2B, CHD8, COPS4, CTTN, CYFIP1, DIAPH1, EPO, EPS15L1, EREG, EZH2, FBXW7, FLOT1, FLT4, FZD4, GIT1, GIT2, GNAS, GPS1, GPS2, GSK3B, H2AC20, H2AC6, H2AZ1, H2BC12, H2BC21, H3-3A, HDAC1, HDAC6, HGS, HSP90AA1, IKZF1, IL32, IRS1, ITGB3, ITS1, ITS2, JAK3, KDM1B, KDM4C, LAMTOR4, LAMTOR5, MAPK6, MAPKAPK2, MAPKAPK3, MLST8, MOV10, MYO9B, NCF1, NCF2, NCKAP1L, NCOA1, NCOA3, NCOR2, NF2, NOTCH2, NRG1, NRP1, PAK4, PHB1, PICALM, PKN1, PKN2, PLCG2, PLEKHG4, POLR2A, POLR2H, POLR2K, POU2F1, PPP2R1A, PSMA1, PSMA6, PSMD12, PTCH1, PTPN1, PTPN6, PXN, PYGO2, RAB7A, RAC2, RAF1, RBBP5, RHOB, RICTOR, RNF20, RNF31, RPS6KA1, RUNX1, S100A8, SH3GL1, SH3KBP1, SKP1, SLK, SNAP23, SOWAHC, SPARC, SPHK1, SREBF1, STAG1, STK10, STK11, STOM, STUB1, STX5, SWAP70, TAOK3, TCF7L2, TCIRG1, TJP2, TMPO, TSC2, VAMP3, VAV1, VIM, YKT6]	1,16E-05
Vía VEGFA-VEGFR2	[ABI2, AKT3, CALM3, CDC42, CYFIP1, HSP90AA1, ITGB3, MAPKAPK2, MAPKAPK3, MLST8, NCF1, NCF2, NCKAP1L, PXN, RICTOR, SPHK1, VAV1]	1,51E-05
Señalización por GTPasas Rho, GTPasas Miro y RHOBTB3	[ABI2, BCR, CALM3, CDC42, COPS4, CTTN, CYFIP1, DIAPH1, FLOT1, GIT1, GIT2, GPS1, H2AC20, H2AC6, H2AZ1, H2BC12, H2BC21, H3-3A, HGS, HSP90AA1, IL32, ITS1, ITS2, KDM4C, MYO9B, NCF1, NCF2, NCKAP1L, NF2, PAK4, PICALM, PKN1, PKN2, PLEKHG4, PPP2R1A, RAB7A, RAC2, RHOB, RNF20, S100A8, SLK, SNAP23, SOWAHC, STK10, STOM, STX5, SWAP70, TAOK3, TJP2, TMPO, VAMP3, VAV1, VIM, YKT6]	2,38E-05
Respuestas celulares al estrés	[AKT3, ARNT, ATP6V0D1, ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1E2, ATP6V1F, ATP6V1G2, ATP6V1H, ATR, CASTOR1, CDKN2A, CDKN2B, DEPDC5, EPO, EXOSC3, EXOSC8, EZH2, FLCN, FNIP1, FNIP2, GSK3B, H2AC20, H2AC6, H2AZ1, H2BC12, H2BC21, H3-3A, HDAC6, HELZ2, HSP90AA1, ITFG2, LAMTOR4, LAMTOR5, MAPKAPK2, MAPKAPK3, MIOS, MLST8, MOV10, NCF1, NCF2, NCOA1, NCOR2, NPRL2, PSMA1, PSMA6, PSMD12, RB1, RPS19BP1, RPS6KA1, SKP1, SZT2, TALDO1, TCIRG1, TRIM21, WDR24, WDR59]	2,43E-05

Ciclo de GTPasa RHOB	[BCR, DIAPH1, FLOT1, MYO9B, PKN1, PKN2, RHOB, SLK, SNAP23, SOWAHC, STK10, STOM, TJP2, VAMP3]	3,28E-05
Respuestas celulares a estímulos	[AKT3, ARNT, ATP6V0D1, ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1E2, ATP6V1F, ATP6V1G2, ATP6V1H, ATR, CASTOR1, CDKN2A, CDKN2B, DEPDC5, EPO, EXOSC3, EXOSC8, EZH2, FLCN, FNIP1, FNIP2, GSK3B, H2AC20, H2AC6, H2AZ1, H2BC12, H2BC21, H3-3A, HDAC6, HELZ2, HSP90AA1, ITFG2, LAMTOR4, LAMTOR5, MAPKAPK2, MAPKAPK3, MIOS, MLST8, MOV10, NCF1, NCF2, NCOA1, NCOR2, NPRL2, PSMA1, PSMA6, PSMD12, RB1, RPS19BP1, RPS6KA1, SKP1, SZT2, TALDO1, TCIRG1, TRIM21, WDR24, WDR59]	5,59E-05
Sistema inmunitario innato	[ABI2, ALOX5, ANPEP, AP2A2, ATP6V0D1, ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1E2, ATP6V1F, ATP6V1G2, ATP6V1H, BIRC3, CALM3, CD53, CD93, CDC42, CLEC10A, CLEC12A, CLEC4A, CLEC4E, CLEC6A, CTSL, CYFIP1, DIAPH1, FTH1, FTL, GNLY, GSDMD, HCK, HLA-C, HSP90AA1, IFI16, LCP2, LY86, MAP3K8, MAPKAPK2, MAPKAPK3, MYO9B, NCF1, NCF2, NCKAP1L, NF2, NLRC5, NLRP1, PLCG2, POLR2H, POLR2K, PPP2R1A, PSMA1, PSMA6, PSMD12, PTPN6, RAB5C, RAB7A, RAC2, RAF1, RPS6KA1, S100A8, SERPINA1, SKP1, SNAP23, STK10, STOM, TCIRG1, TNFAIP6, TRIM21, TXNDC5, UBE2V1, VAV1]	7,15E-05
Ciclo de GTPasa RAC1	[ABI2, BCR, CDC42, CYFIP1, GIT1, GIT2, MYO9B, NCF1, NCF2, NCKAP1L, PAK4, PKN1, PKN2, PLEKHG4, RAB7A, SNAP23, SWAP70, TAOK3, TMPO, VAMP3, VAV1, YKT6]	1,44E-04
Ciclo de GTPasa RHOC	[BCR, DIAPH1, FLOT1, MYO9B, PKN1, PKN2, SLK, STK10, STOM, STX5, TJP2, TMPO, VAMP3]	4,52E-04
Reciclaje del receptor de insulina	[ATP6V0D1, ATP6V0E2, ATP6V1B2, ATP6V1E2, ATP6V1F, ATP6V1G2, ATP6V1H, TCIRG1]	6,11E-04

* p_{adj} : significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 36. Rutas Reactome de la comparación EMSP con EMPP. Clúster 6. Rutas Reactome derivadas del análisis funcional en el **clúster 6**, identificado mediante ClueGO, para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **EMSP** y pacientes con **EMPP**

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	* p_{adj}
Transporte anterógrado del RE al Golgi	[ACTR10, ACTR1A, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP3, CAPZA1, CD59, CNIH3, CTSC, CTSZ, DCTN4, DCTN6, F8, LMAN2L, PREB, SCFD1, SEC24A, SEC24C, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	1,29E-21
Transporte al Golgi y modificación posterior	[ACTR10, ACTR1A, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP3, CAPZA1, CD59, CNIH3, CTSC, CTSZ, DCTN4, DCTN6, F8, LMAN2L, PREB, SCFD1, SEC24A, SEC24C, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	1,18E-19
Presentación de antígenos por MHC clase II	[ACTR10, ACTR1A, CAPZA1, CTSC, DCTN4, DCTN6, HLA-DMB, KIF22, KIF3A, KIF5A, KLC2, KLC4, SEC24A, SEC24C, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	9,54E-17
Tráfico de membranas	[ACTR10, ACTR1A, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP3, CAPZA1, CD3G, CD59, CNIH3, CTSC, CTSZ, DCTN4, DCTN6, F8, FNBP1, GRB2, KIF22, KIF3A, KIF5A, KLC2, KLC4, LMAN2L, PREB, RHOQ, SCFD1, SEC24A, SEC24C, TRIP10, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	3,61E-16
Transporte retrógrado del Golgi al RE	[ACTR10, ACTR1A, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP3, CAPZA1, DCTN4, DCTN6, KIF22, KIF3A, KIF5A, KLC2, KLC4, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	4,29E-16
Transporte mediado por vesículas	[ACTR10, ACTR1A, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP3, CAPZA1, CD3G, CD59, CNIH3, CTSC, CTSZ, DCTN4, DCTN6, F8, FNBP1, GRB2, KIF22, KIF3A, KIF5A, KLC2, KLC4, LMAN2L, PREB, RHOQ, SCFD1, SEC24A, SEC24C, TRIP10, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	2,22E-15

Glucosilación unida a asparagina (N-linked)	[ACTR10, ACTR1A, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP3, CAPZA1, CD59, CNIH3, CTSC, CTSZ, DCTN4, DCTN6, F8, LMAN2L, PREB, SCFD1, SEC24A, SEC24C, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	1,39E-14
Transporte anterógrado mediado por COPI	[ACTR10, ACTR1A, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP3, CAPZA1, CD59, DCTN4, DCTN6, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	9,16E-13
Tráfico intra-Golgi y retrógrado del Golgi al RE	[ACTR10, ACTR1A, ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP3, CAPZA1, DCTN4, DCTN6, KIF22, KIF3A, KIF5A, KLC2, KLC4, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	1,13E-12
Tráfico retrógrado del Golgi al RE dependiente de COPI	[ARF3, ARF4, ARFGAP1, ARFGAP3, KIF22, KIF3A, KIF5A, KLC2, KLC4, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	1,46E-11
Concentración de carga en el RE	[CD59, CNIH3, CTSC, CTSZ, F8, LMAN2L, PREB, SEC24A, SEC24C]	6,55E-10
Tráfico retrógrado del Golgi al RE independiente de COPI	[ACTR10, ACTR1A, CAPZA1, DCTN4, DCTN6, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	1,56E-09
Ciclo de chaperonas HSP90 para receptores de hormonas esteroides (SHR) en presencia de ligando	[ACTR10, ACTR1A, CAPZA1, DCTN4, DCTN6, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	3,41E-09
Kinesinas	[KIF22, KIF3A, KIF5A, KLC2, KLC4, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	7,01E-09
Sellado de la envoltura nuclear (NE) por ESCRT-III	[CC2D1B, IST1, LEMD2, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	1,52E-08
Transporte de vesículas mediado por COPII	[CD59, CNIH3, CTSC, CTSZ, F8, LMAN2L, PREB, SCFD1, SEC24A, SEC24C]	2,94E-08
Factores implicados en el desarrollo de megacariocitos y producción de plaquetas	[CAPZA1, KIF22, KIF3A, KIF5A, KLC2, KLC4, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	2,10E-05
Reensamblaje de la envoltura nuclear (NE)	[CC2D1B, IST1, LEMD2, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	2,23E-05
Tráfico dependiente de microtúbulos de conexones desde el Golgi a la membrana plasmática	[TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	2,68E-05
Transporte de conexones a la membrana plasmática	[TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	3,55E-05
Ruta de plegamiento de tubulina posterior a chaperoninas	[TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	7,74E-05
Formación de intermedios de plegamiento de tubulina por CCT/Tric	[TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	1,50E-04
Translocación de SLC2A4 (GLUT4) a la membrana plasmática	[KIF3A, RHOQ, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	2,16E-04
Activación de AMPK aguas abajo de los NMDAR	[TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	3,15E-04
Autofagia selectiva	[MAP1LC3A, TOMM40, TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	4,60E-04
Cooperación de prefoldina y Tric/CCT en el plegamiento de actina y tubulina	[TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	5,04E-04
Las GTPasas RHO activan a IQGAPs	[TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	5,04E-04
Ciclo de GTPasa RHOQ	[CPNE8, FBNP1, RHOQ, STEAP3, TRIP10, WWP2]	7,87E-04
Ensamblaje de uniones gap	[TUBA8, TUBB1, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6]	8,82E-04
RUNX1 interactúa con cofactores cuyo efecto preciso sobre los objetivos de RUNX1 no se conoce	[ARID1A, PCGF5, SMARCC2, SMARCD2, SMARCD3]	1,14E-03

* p_{adj} : significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado comparando el número de genes encontrados frente al esperado al azar, tras corrección por Bonferroni.

Tabla suplementaria 37. Rutas Reactome de la comparación OIND con EM. Rutas Reactome para los genes de los que derivaban las isoformas de procesamiento alternativo con expresión diferencial entre pacientes con **OIND** y pacientes con **EM**.

Ruta Reactome	Genes asociados encontrados	*FDR
Transcripción estimulada por NGF	[ERG1, ERG3, FOSB]	3.42E-04
Eventos nucleares (activación de quinasas y factores de transcripción)	[[ERG1, ERG3, FOSB]	6.95E-04
RUNX3 regula la transcripción mediada por RUNX1	[RUNX1]	1.30E-03
Señalización por NTRK1 (TRKA)	[ERG1, ERG3, FOSB]	3.30E-03
Señalización por NTRKs	[EGR1, EGR3, FOSB]	4.73E-03
Regulación transcripcional por RUNX3	[RUNX1]	2.10E-02
Regulación de genes dependientes de MITF-M involucrados en la biogénesis lisosomal y la autofagia	[ATP6V1C1]	2.62E-02
Regulación de la expresión y actividad de RUNX1	[RUNX1]	2.98E-02
ATF4 activa genes en respuesta al estrés del retículo endoplásmico	[ATF3]	3.00E-02
PERK regula la expresión génica	[ATF3]	4.18E-02
Señalización por receptores tirosina quinasa	[ATP6V1C1, EGR3, EGR1, FOSB]	4.26E-02
Respuesta celular a la privación de nutrientes	[ATP6V1C1, ATP3]	4.26E-02

*FDR: significación estadística del enriquecimiento de genes en la vía, calculado tras corrección por Benjamini-Hochberg para controlar la tasa de descubrimientos falsos

11. ANEXO III

Tabla suplementaria 38. Cebadores diseñados y probados experimentalmente mediante qPCR (n = 60). Se detallan las secuencias forward y reverse (F y R), el tamaño esperado de la banda de amplificación obtenido por electroforesis expresado en pares de bases (pb), la eficiencia (E) estimada a partir de la curva estándar; Th (temperaturas de hibridación) y Tm (temperatura de *melting*); %GC: contenido de guanina y citosina; Auto-C: Auto-complementariedad; 3' Auto-C: Auto-complementariedad 3' y finalmente el estado de inclusión o exclusión en el análisis de expresión génica.

Isoforma	Secuencia de cebadores	Th	% GC	Auto-C	3' Auto-C	Banda (pb)	Tm	E	Estado
IL1α-201-F	CAGCCAGAGAGGGAGTCATTT	59,40	52	3	0	72	1 pico a 78,0	1,98	Incluido
IL1α -201-R	TGTCCTGGAACCTTGGCCATCTT	60,10	45	6	2		±0,5		
IL1β-201-F	TCCCCAGCCCTTTTGTGAG	60,18	55	2	0	113	1 pico a 82,4	2,19	Incluido
IL1β-201-R	GGAGCGAATGACAGAGGGTT	59,75	55	3	0		±0,5		
IL1β-205-F	GGCCCTAAACAGATGAAGGT	57,3	50	4	1	84	1 pico a 77,9	1,8	Incluido
IL1β-205-R	CTCCCTTCTTTGAGCTTTCCCT	60,3	50	4	0		±0,5		
IL1β-206-F	GCCTCTGCTACCACTTATTC	60,49	55	4	0	78	1 pico a 80,5	2,21	Incluido
IL1β-206-R	ATAGACCTGTTCCAGCTTTTCC	60,31	48	4	0		±0,5		
IL1β-207-F	GCTCCAGCTCTCCTAGCCAA	61,33	60	4	1	175	1 pico a 80	2,52	Incluido
IL1β-207-R	ATGACGGCTACGTTTCATGTGT	60,07	48	4	0		±0,5		
IL1β-208-F	AAGTAGCTCTGTTGCTCGGC	60,59	55	4	2	99	1 pico a 81,5	2,87	Incluido
IL1β-208-R	GGAGTGGGGTGGCTAAGAAC	60,04	60	3	1		±0,5		
IL1R1-205-F	TGCCTCATGCTGACTTGCGAG	60,96	55	4	2	154	1 pico a 79,8	2,02	Incluido
IL1R1-205-R	TTCCCAAGCCCTCTACTCTGA	59,92	52	3	3		±0,5		
IL1RN-205-F	GCCTCCGAGTCACCTAAT	59,48	58	4	2	263	1 pico a 81,6	2	Incluido
IL1RN-205-R	GGACAGGCACATCTTCCCTC	60,11	60	4	2		±0,5		
IL18-206-F	GTAGGGGGAGCGTTGCATAG	60,25	60	2	0	174	1 pico a 78,5	1,83	Incluido
IL18-206-R	TCTTCTTGCCCCACCCATTC	59,96	55	3	0		±0,5		
MUTYH-209-F	Cebadores no exclusivos								Excluido
MUTYH-209-R									
NFκB2-203-F	CGGAGAGAAGCCGCAACC	60,82	67	5	0	92	1 pico a 86,4	2,23	Incluido
NFκB2-203-R	GCCCTCCTCCCTCTTTTCTCTT	61,43	55	6	6		±0,5		
NFκB1-214-F	CAGGGTCATCCTAGATCGTACT	58,24	50	5	2	Doble banda	2 picos	-	Excluido
NFκB1-214-R	TGTCACCGCGTAGTCGAAAA	59,97	50	4	2				
NFκBIA-204-F	GCTCCTCGTGCTTATGTTGTG	59,61	52	2	0	71	1 pico a 76,0	2,14	Incluido
NFκBIA-204-R	GAAACCAAAAGGAATTTGAGATGCT	58,77	36	4	2		±0,5		
NFκBIA-205-F	ATGTAGCAGAGTCACCCAGAG	60,27	52	3	0	88	1 pico a 79,7	3,1	Incluido
NFκBIA-205-R	GATGTGGGCTGATGTGAAGTA	57,73	48	2	2		±0,5		
NFκBIA-206-F	GGGTTGAGGGGAACCTCGG	59,33	67	3	1	70	1 pico a 80,1	2,5	Incluido
NFκBIA-206-R	CTACGAATGCAAGAGAGACCA GA	59,87	48	4	0		±0,5		
NFκBIA-207-F	CAACTACAATGGAGCCCTGT	57,5	50	5	2	103	1 pico a 82,5	2,66	Incluido
NFκBIA-207-R	ACATCAGCCCCACACTTCAA	59,52	50	3	3		±0,5		
NFκBIA-208-F	TGTCAATGCTCAGCTCACCT	59,31	50	5	3	155		2,22	Incluido

Anexo III

NFkBIA-208-R	GCTCGTCTCTGTGAACTCC	60,11	60	3	1		1 a pico 84,7 ±0,5			
NFkBIA-209-F	CGAAGTCCCCGGTTGCATAA	60,39	55	4	1					
NFkBIA-209-R	CTCGGAACGCCCTGTACTTC	60,46	60	4	1	90	2 picos	-		Incluido
NFkBIA-210-F	CTCCATCCTGAAGGCTACCAAC	60,42	55	4	0					
NFkBIA-210-R	GTTTAAGCTCTTGCCTGGACT	58,22	48	4	1	-	-	-		Excluido
NFkBIZ-203-F	AGGTCAGACGGCGAGTTCTT	61,18	55	5	0					
NFkBIZ-203-R	TGGGGCTCAACCTCGAGAGT	62,73	60	6	6	-	-	-		Excluido
NFkBIZ-206-F	CTGTGCAGTCATAGCCACAA	60,61	52	4	0					
NFkBIZ-206-R	TGCCATTGTAAGCCTTCGCT	60,32	50	5	2	167	1 pico a 81 ±0,5	2,7		Incluido
NFkBIZ-209-F	AGCAGAGGATAAGGGTTTGGG	59,43	52	2	0					
NFkBIZ-209-R	CAGCAGTTTCCTTTCTTTGACG	58,96	43	2	2	109	1 pico a 76 ±0,5	3,54		Incluido
NFkBIZ-201-F	ACACAGTTCAAACCTCCTCC	55,5	45	6	0					
NFkBIZ-201-R	TCCACCTGCCACTGAAAAAG	58,31	50	3	0	-	-	-		Excluido
NFkBIZ-205-F	AAGTTAGAGGCCATCCTCAGC	59,51	52	4	2					
NFkBIZ-205-R	GCAAGTGGTCAAGCATCCCA	60,3	58	3	2	72	1 pico a 77,7 ±0,5	2,56		Incluido
NFkBIZ-210-F	GCTTGGGATTAAGCAAGGCA	58,81	50	4	0					
NFkBIZ-210-R	TCACCCAGTCTCCTGAATGTC	59,1	52	3	2	86	1 pico a 78,2 ±0,5	2,63		Incluido
CASP1-205-F	CAAGAAGCTGAGACGGGATTG T	60,61	50	4	0					
CASP1-205-R	GCTGAGCTTCTGACTTCGTT	58,21	50	5	0	153	1 pico a 75,5 ±0,5	3,07		Incluido
CASP1-213-F	TTTCCGCAAGGAAGTGAAGA	57,37	45	4	0					
CASP1-213-R	TCCCTGTTTCTCAGTGTGGG	59,86	52	3	0	Doble banda	2 picos	-		Excluido
TNF-208-F	AGAACTCACTGGGGCCTACA	60,18	55	4	2					
TNF-208-R	GCTCCGTGTCTCAAGGAAGT	59,68	55	5	1	177	1 pico a 81,8 ±0,5	1,98		Incluido
NLRP3-201-F	Cebadores no exclusivos									Excluido
NLRP3-201-R										
NLRP3-202-F	Cebadores no exclusivos									Excluido
NLRP3-202-R										
NLRP3-204-F	Cebadores no exclusivos									Excluido
NLRP3-204-R										
NLRP3-205-F	Cebadores no exclusivos									Excluido
NLRP3-205-R										
NLRP3-206-F	TTCCTCTAGCTGTTCTGAG	58,64	50	4	3					
NLRP3-206-R	TCGGTCCACACAGAAAGTTC	57,77	50	4	4	106	1 pico a 80,2 ±0,5	3,2		Incluido
NLRP3-208-F	Cebadores no exclusivos									Excluido
NLRP3-208-R										
NLRP3-209-F	GCTTGCTCTCTCATCTCTT	59,51	52	2	0					
NLRP3-209-R	CCCCAACCACAATCTCCGAA	59,96	55	3	2	No banda	2 picos	-		Excluido
BUD31-206-F	Cebadores no exclusivos									Excluido
BUD31-206-R										
CETN3-201-F	Cebadores no exclusivos									Excluido
CETN3-201-R										
PLAUR-204-F	Cebadores no exclusivos									Excluido
PLAUR-204-R										
PLAUR-214-F	AACGAGGGCCCAAAACCGAA	62,63	50	6	0	75		2,39		Incluido

PLAUR-214-R	GGCATGTTGGCACATTGAGG	60,11	55	5	1		1 pico a 79,5 ±0,5		
ICAM1-201-F	TTTGTAGCCACCTCCCCAC	59,4	55	2	0	94	1 pico a 80,9 ±0,5	1,85	Incluido
ICAM1-201-R	GCATATTCCTGGGCACTCA	59,4	55	5	2				
ICAM1-203-F	GACCAGACCTAGCAATAGAC	57,95	43	4	1	199	1 pico a 79,3 ±0,5	2,29	Incluido
ICAM1-203-R	GGGAGCCCTACCTCTTCAGTA	60,06	60	4	2				
C2orf88-202-F	GCCAGCTGTTGTCATCATTCA	59,19	48	6	1	193	2 picos	-	Excluido
C2orf88-202-R	TCCACCAGTCGGTCTCATTC	59,1	55	3	0				
RPL15-210-F	TGCCCTAGTCAGGAATGGAGT	60,27	52	4	1	225	1 pico a 75,6 ±0,5	1,79	Incluido
RPL15-210-R	GCCCAAGGTCAATCTCCAC	60,68	60	2	0				
ELAC1-201-F	CATGAGACGTTGGACAGGCA	60,32	55	4	0	80	1 pico a 76,6 ±0,5	1,95	Incluido
ELAC1-201-R	ACCTAGCCAAACCCTGCATT	56,59	50	4	1				
PURA-201-F	AGGAGCGGGAAGGTATCAGT	60,03	55	2	1	138	1 pico a 77,8 ±0,5	2,1	Incluido
PURA-201-R	CACACTCAACCAGGGAGCAT	58,96	55	3	2				
SLC35A5-206-F	TCTGTCATTAGGGTGGGATGT	58,81	45	3	0	206	-	-	Excluido
SLC35A5-206-R	TCCTGCTGTACCTCATTTCCC	59,44	52	4	0				
FAM200B-201-F	Cebadores no exclusivos								Excluido
FAM200B-201-R									
FBLN2-201-F	Cebadores no exclusivos								Excluido
FBLN2-201-R									
JHY-201-F	Cebadores no exclusivos								Excluido
JHY-201-R									
CCL4-202-F	AGCACCAATGGGCTCAGAC	58,8	58	7	3	-	-	-	Excluido
CCL4-202-R	CTGGGATCAGCACAGACT	56	56	5	3				
CCL3-204-F	CATTCCGTACCTGCTCAGAA	60,30	52	4	3	190	1 pico a 81,7 ±0,5	2,3	Incluido
CCL3-204-R	CTGGCTGCTCGTCTCAAAGTA	60,10	52	3	2				
CCL3L3-203-F	CCTAGTCTCCAGTTGCTGCTG	60,41	57	4	4	103	1 pico a 82,3 ±0,5	2,2	Incluido
CCL3L3-203-R	CTGGCTGCTCGTCTCAAAGT	60,32	55	3	1				
CXCL8-202-F	GACCATACATAGTTTGCCAGGA	60,12	48	4	1	89	1 pico a 77,0 ±0,5	2,08	Incluido
CXCL8-202-R	AGGACACTACTGGGAGTGACAA	60,43	50	6	2				
CXCL2-202-F	AGGTCAAACCAAGTTAGTTCA	57,5	41	3	1	74	1 pico a 73,3 ±0,5	2,1	Incluido
CXCL2-202-R	TGACTAGAGAATATCTGCAAACCT	57,20	38	5	2				
CXCL2-203-F	TTGTCTCAACCCGCATCG	60,38	58	3	2	123	1 pico a 79,1 ±0,5	2,04	Incluido
CXCL2-203-R	CAGACGCCAGTATTTCTGACCA	60,35	50	5	2				
CXCL3-204-F	AAGGGTTCCGCGATCTTGG	60,08	58	5	2	231	1 pico a 74,9 ±0,5	2,3	Incluido
CXCL3-204-R	CAGCGCAGTTCAGTGACCA	60,60	58	5	3				
CXCL3-201-F	AAATGACAGGGTGGGGAAGTCTG	60,00	52	3	1	86	1 pico a 80,1 ±0,5	1,51	Incluido
CXCL3-201-R	TTCCCTTACCCTAACAGTGATCC	59,20	48	4	2				
CXCL1-201-F	CTGGCTTAGAACAAAGGGGCT	60,30	52	4	1	136	1 pico a 73,7 ±0,5	1,91	Incluido
CXCL1-201-R	TAAAGGTAGCCCTTGTTTCCCC	60,00	50	4	0				
PLAU-201-F	CTCCTGCCGCAGCCAC	60,50	75	7	1	-	-	-	Excluido
PLAU-201-R	AGTTCAATTGCTGCCTTTGGA	58,00	45	3	0				
RNASEL-201-F	AGGTTGCTGTGAGGGATGA	58,9	50	2	1	133	1 pico a 78,4 ±0,5	1,97	Incluido
RNASEL-201-R	CATTAGGGGTCAAGGCACTCA	59,70	52	2	1				

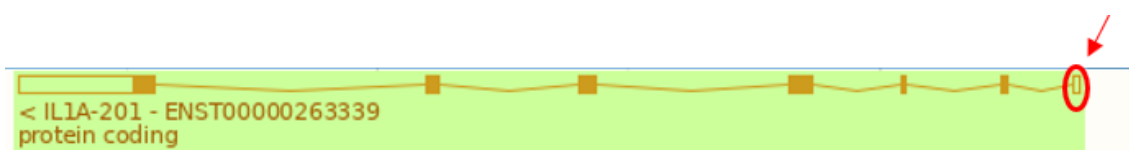
Tabla suplementaria 39. Cebadores de reserva. Cebadores diseñados, pero no utilizados experimentalmente (n = 34). Corresponden a isoformas seleccionadas inicialmente pero que quedaron en reserva y no fueron evaluadas por qPCR. Auto-C: Auto-complementariedad; 3'Auto-C: Auto-complementariedad 3'. Cebadores no aptos: según los criterios estándar de diseño.

Isoforma	Secuencia de cebadores	Th	% GC	Auto-C	3' Auto-C
AGK-212-F	AAATGGTCACATCCACCCCA	59.22	50	3	0
AGK-212-R	TGCTGTAGAGTGTCTTGCCT	58.66	50	4	0
BCL11A-219-F	GCGCACAGACATGCTTACTC	59.63	55	4	2
BCL11A-219-R	CCGTTCTGTCAAACCAACC	59.33	55	3	1
BNIP3-201-F	CTCTGCTGCTCTCTCATTTGC	59.33	52	3	2
BNIP3-201-R	CTTCATCAAAAGGTGCTGGTGG	60.03	50	4	0
CASP1-208-F	ACTCAGTCTTCAGGTC	58,76	52	5	0
CASP1-208-R	GAAATGTCCCCCTCCTCACAG	60,07	57	4	1
CISD1-201-F	TGCATCAACTCCCAGTGTCTTCT	60.16	45	4	1
CISD1-201-R	CCAGGTCCCCCTGACATTAC	60.06	57	4	0
CPNE8-204-F	GTGCCAAAGAAGCAACAAGTGG	61.05	50	3	1
CPNE8-204-R	TACTGGGAGCCATCCTTTACA	58.16	48	3	2
EIF2S1-201-F	CCAGTACCTTGCCGAGACTT	60.16	45	4	1
EIF2S1-201-R	GTTTGATGGCTTCTGCCTC	60.06	57	4	0
KCTD10-205-F	GGAAGTGATAGGAGTGCCAGC	60.47	57	3	2
KCTD10-205-R	TAAAGCACTGCCCAGGTCTC	59.68	55	5	2
LYST-203-F	ACTTCTTTTAACTATGGGCAAACA	57.65	32	6	0
LYST-203-R	ACAAAGACCTAATTCTATTTGAGGC	57.37	36	4	2
MRPS33-201-F	TCAGTCTTGTGGGAGGGACT	59.81	55	4	1
MRPS33-201-R	TGTGATTTGGGCTTCTGGCT	59.89	50	2	0
MTSS1-216-F	AAGAGTTGCCCCAGGACATT	60,9	50	4	1
MTSS1-216-R	TCCTTGCTGGAGTCAAAACC	60,2	50	4	0
NMRK1-207-F	CCTCAAACAAGCAAGCCCAT	59.65	48	2	2
NMRK1-207-R	GTGTTCTTTGTAGCTGTGGCAG	60.03	50	4	3
NFYB-201-F	GCTGCATTGGAGGTTGAAATCAC	60.92	48	5	2
NFYB-201-R	CTGTCACCATCCATTGTCATG	56.95	48	4	4
NLRP3-203-F	GAACAGCCACCTCACTTCCA	59,89	55	3	0
NLRP3-203-R	GGAGATGTCAAGCAGCACT	60,11	55	4	2
NLRP3-207-F	TGGGTAAGGAACTCGGCT	58,23	53	2	0
NLRP3-207-R	CATCCCATTTATCCACCTACC	55,49	48	2	0
PARS2-201-F	CCTTCTCACAAAGATGGA	60	50	3	0
PARS2-201-R	TCCATGAGCTGTGCTGTTTC	60	50	4	0
PLAGL2-201-F	CCGCACAATGGCCCGAC	61.55	71	4	1
PLAGL2-201-R	ATTGAGAAAGCCTCCCCATCC	59.78	52	4	0
PLL-201-F	ATACTCCCTTTGGGCGAAGC	60.11	55	4	2
PLL-201-R	CAACCACATGACAACCTCGCC	59.76	55	4	1
BST1-201-F	Cebadores no aptos				
BST1-201-R					
BST1-202-F	Cebadores no aptos				

BST1-202-R					
BST1-203-F	CACCCATCCTGACTGTGCCTT	62,34	57	2	0
BST1-203-R	ACAACATACAACCAAGCCAGCC	61,66	50	2	1
BST1-204-F	Cebadores no aptos				
BST1-204-R					
BST1-205-F	Cebadores no aptos				
BST1-205-R					
ELANE-202-F	CCCAGCACAGGGCTATAAGA	58,87	55	5	1
ELANE-202-R	ACAGGCGAGGAAAAGACACG	60,6	55	2	2
FCGR3A-202-F	GAAATTGGTGGGTGACAGAGATG	59,56	48	4	0
FCGR3A-202-R	CCTTTGGGAGATCAGTCCGC	60,46	60	4	2
FCGR3A-204-F	TGGGGTTACGGGGGAGAAT	59,92	57	3	2
FCGR3A-204-R	CTTCTCGAGCACCTGTACC	59,83	60	6	2
FCGR3A-205-F	Cebadores no exclusivos				
FCGR3A-205-R					
FCGR3A-206-F	AAAGTTGGTCTCACCGAGGC	60,25	55	3	3
FCGR3A-206-R	AGGAATAAGGTGACGGTGCC	59,75	55	3	2
MUTYH-209-F	Cebadores no exclusivos				
MUTYH-209-R					
PGAMI-201-F	GTGACTTGGGTTTTGCGAG	57,88	50	3	0
PGAMI-201-R	TCCTCACTGGTCATGGCTT	58,22	53	4	1
PRDX6-201-F	AGGAGGTGTAGCAGGTGTGA	60,18	55	2	1
PRDX6-201-R	TAGCAACCCACTGCAAGAAGA	59,58	48	4	0
PRDX6-202-F	ACTGATTCTTCATCTCCCACTCC	60,08	46	3	0
PRDX6-202-R	TGCAGACAGAAAAGAGATGAGG	58,06	45	4	0
PRDX6-203-F	TTTTCTTCCTTCAGATGGGGC	58,83	45	3	2
PRDX6-203-R	AAATTCTGGTGCCAGCTTTGC	60,27	48	6	3
S100A6-204-F	TGAGCAAGAAGGAGCTGAAGGA	61,36	50	4	0
S100A6-204-R	CTTCAAAGGACAAGGGTGGGA	62,16	55	3	0

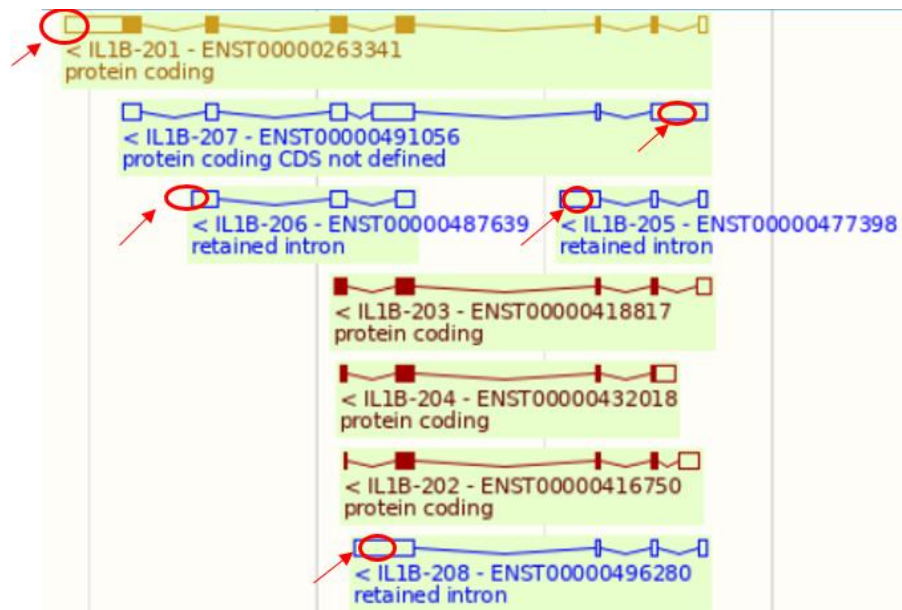
Figura suplementaria 1. Representación gráfica de la localización de los 38 pares de cebadores diseñados para qPCR a lo largo de los 23 genes que finalmente ha sido incluido en el análisis transcriptómico. Se representa también la localización de cebadores que, aunque no se hayan incluido en el análisis, corresponden a otras isoformas diseñadas en el mismo gen.

IL1 α -201

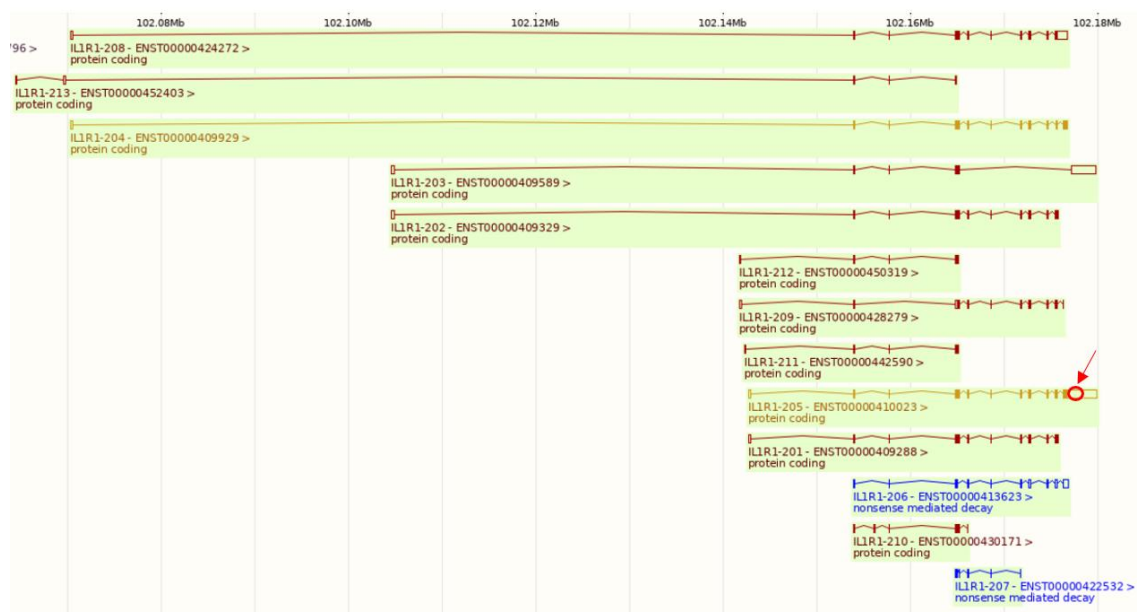


Anexo III

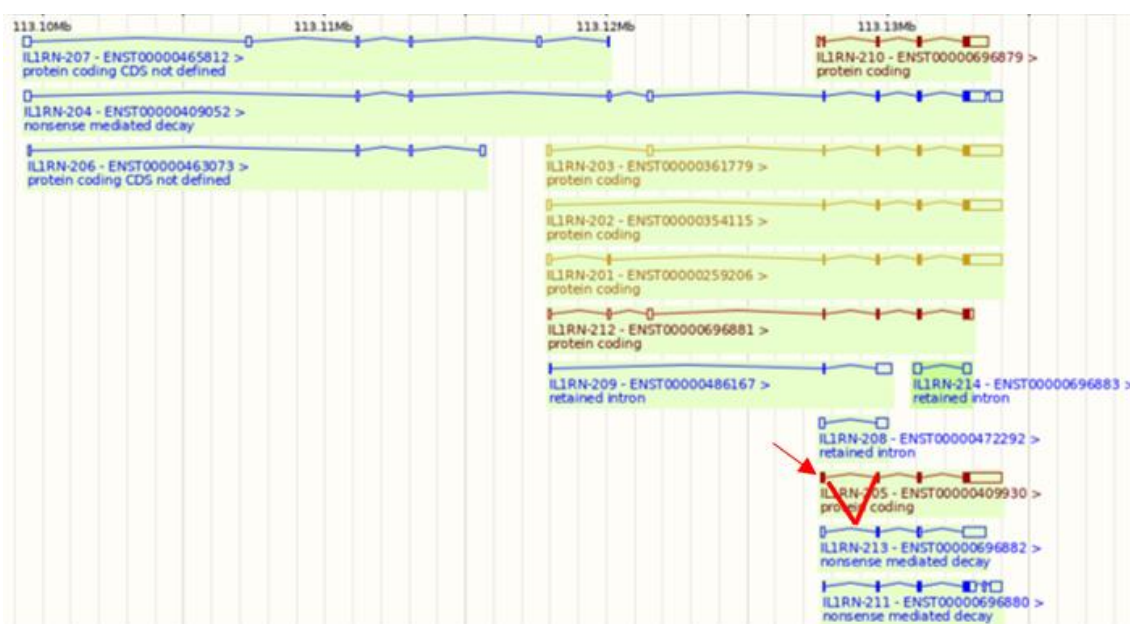
IL1 β -201, IL1 β -205, IL1 β -206, IL1 β -207, IL1 β -208



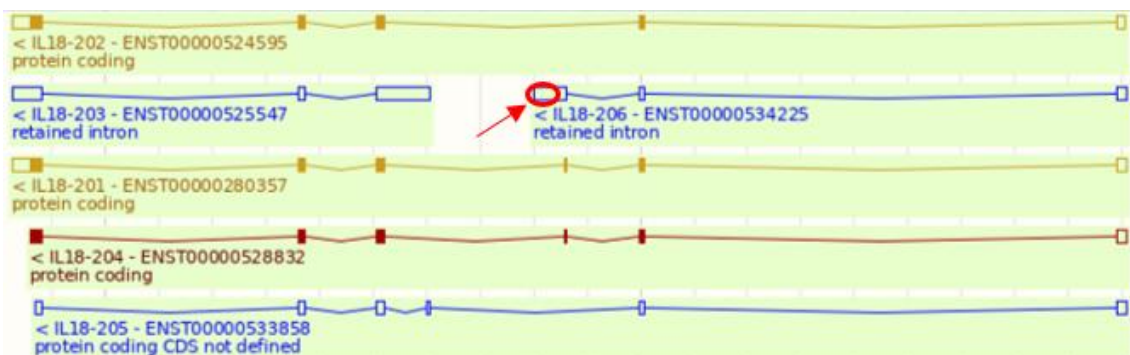
IL1R1-205



IL1RN-205



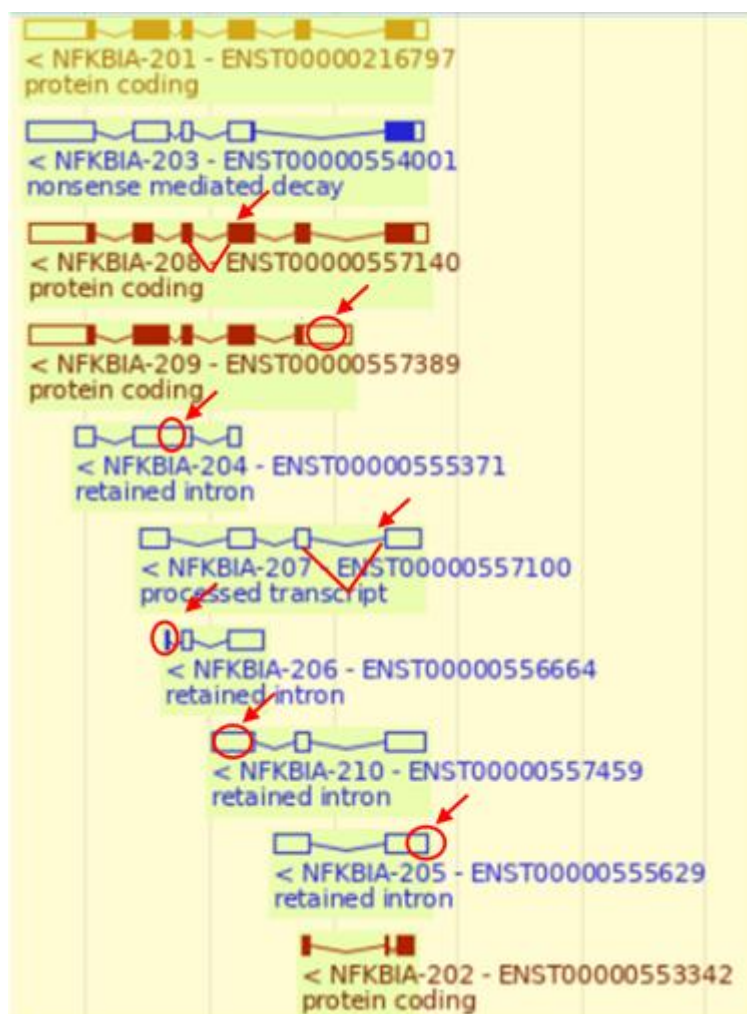
IL18-206



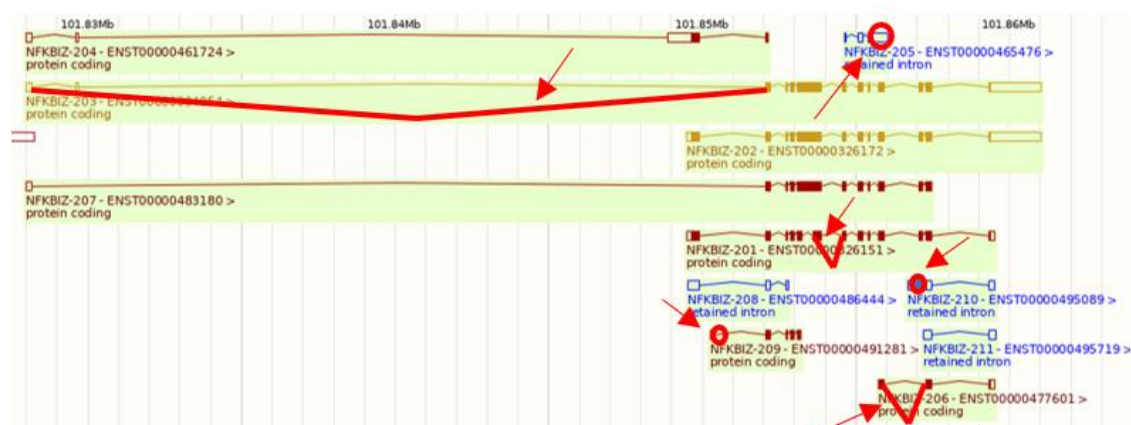
NFKB2-203



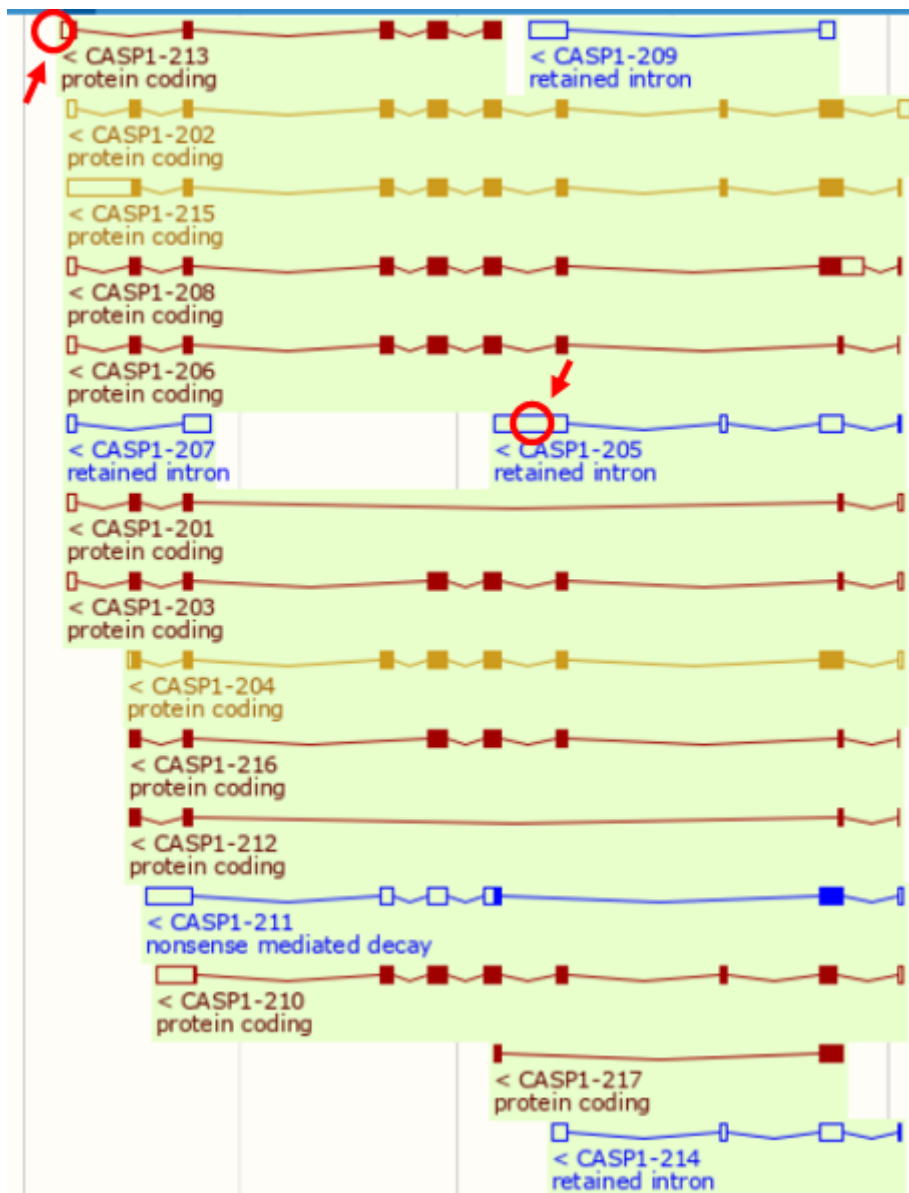
NFKBIA-204, NFKBIA-205, NFKBIA-206, NFKBIA-207, NFKBIA-208, NFKBIA-209, NFKBIA-210



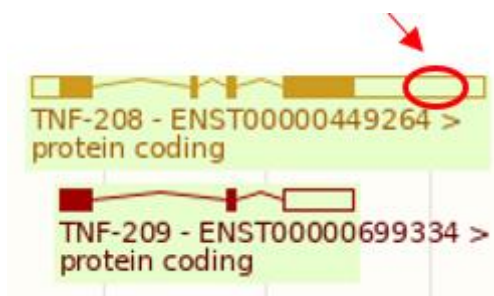
NFKBIZ-203, NFKBIZ-206, NFKBIZ-209, NFKBIZ-201, NFKBIZ-205, NFKBIZ-210



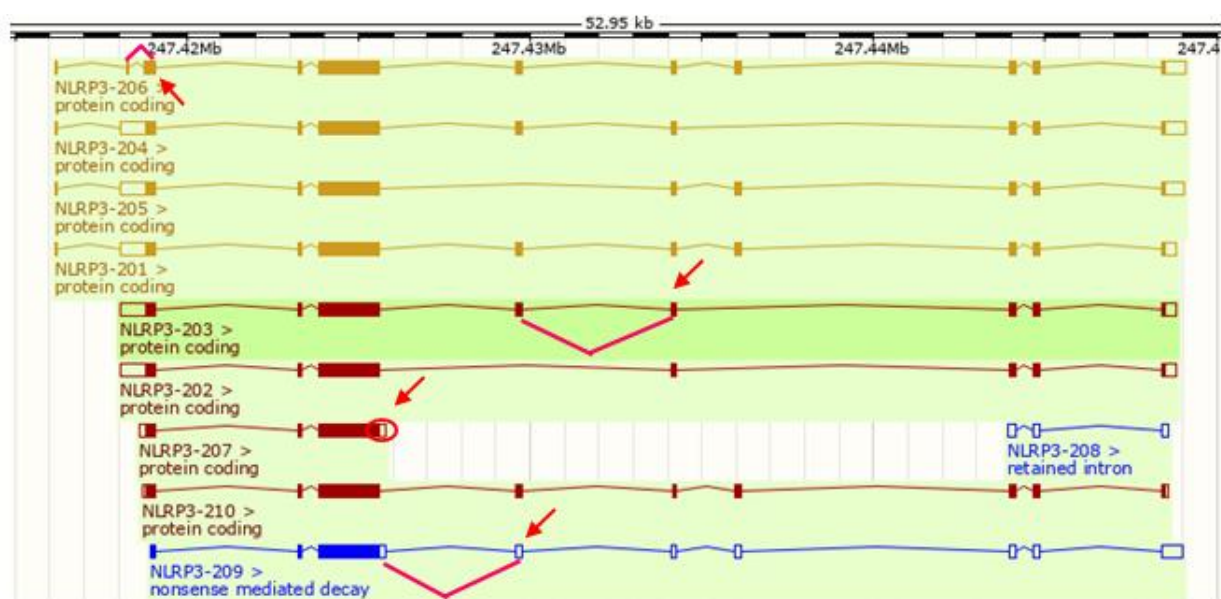
CASP1-205, CASP1-213



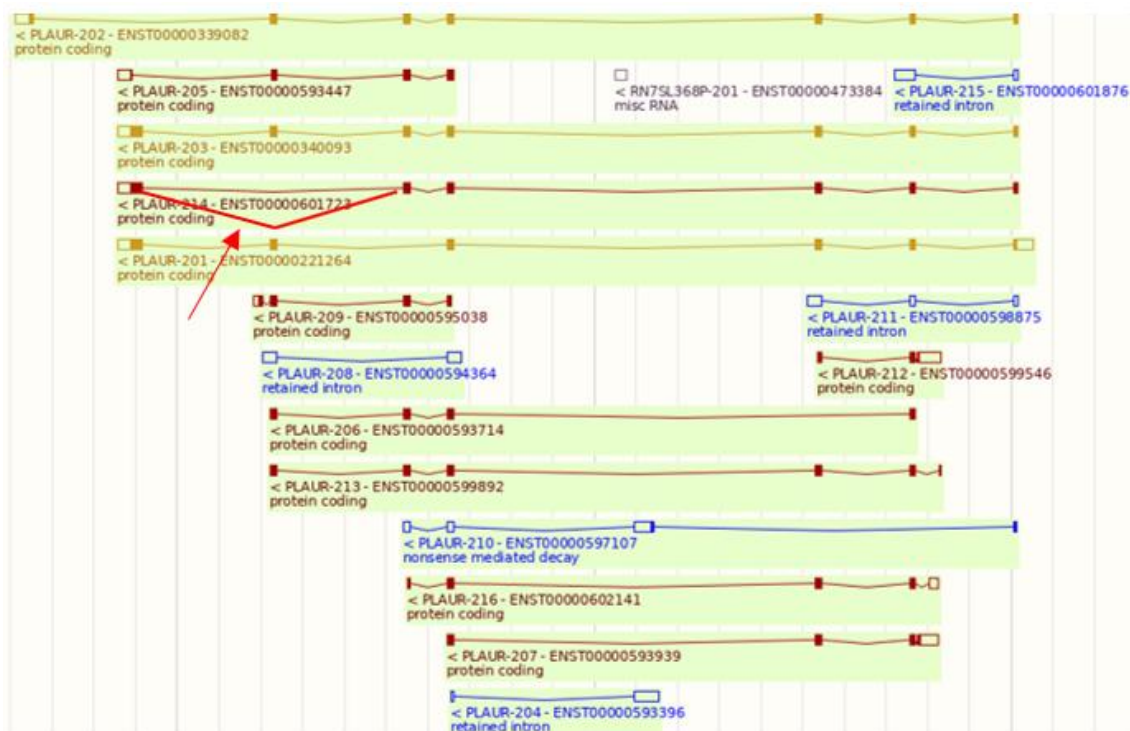
TNF-208



NLRP3-203, NLRP3-206, NLRP3-207, NLRP3-209

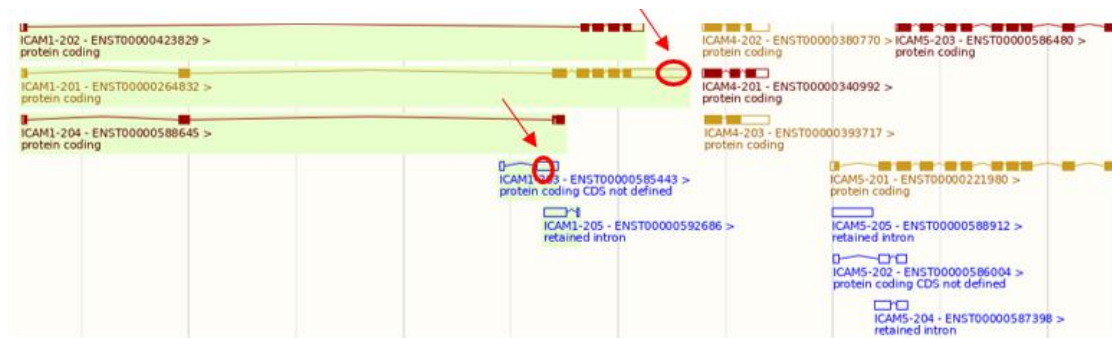


PLAUR-214

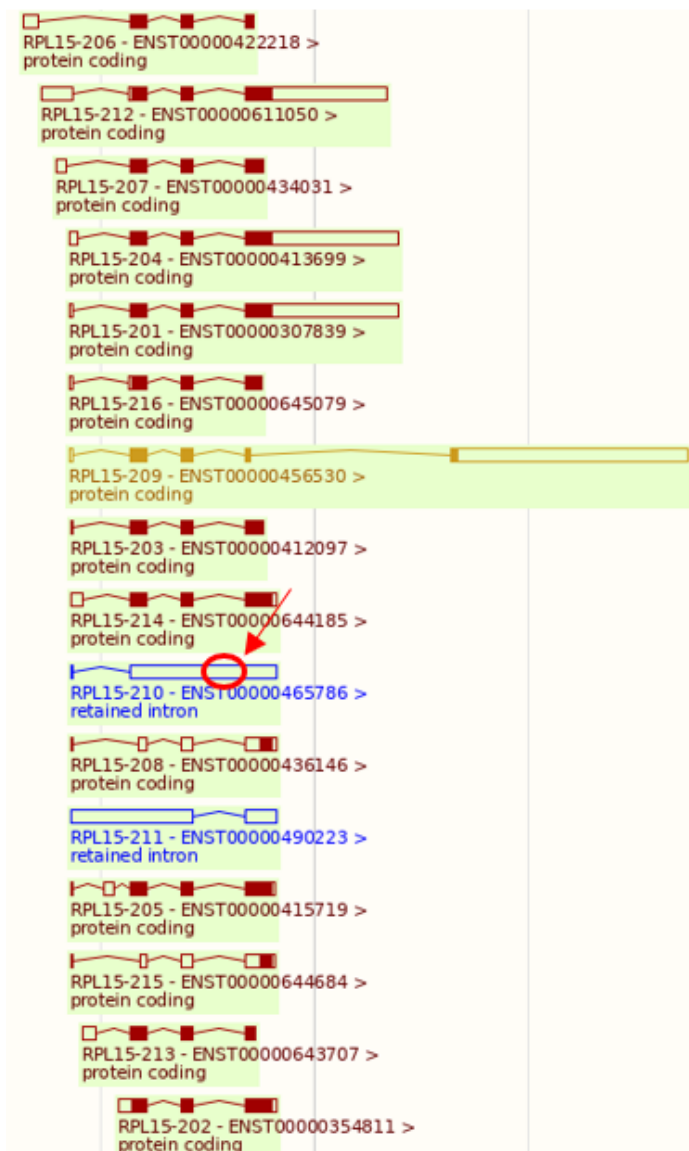


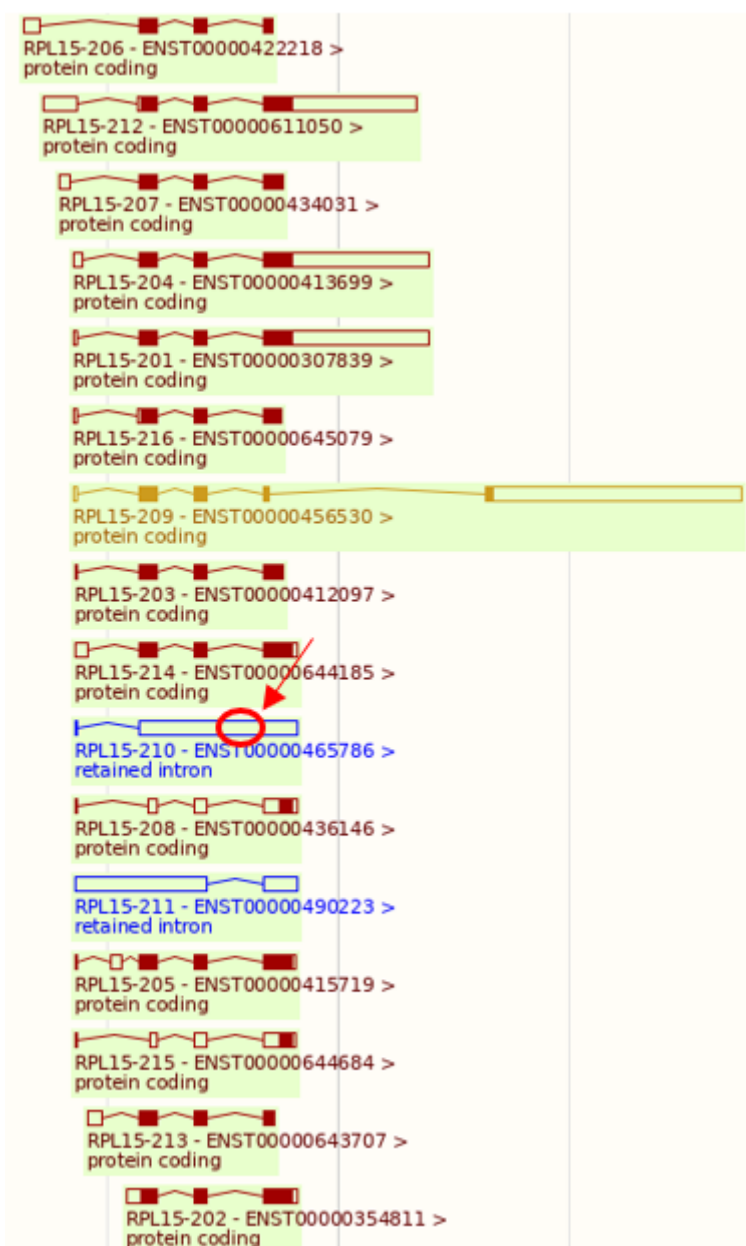
Anexo III

ICAM1-201, ICAM1-203



RPL15-210

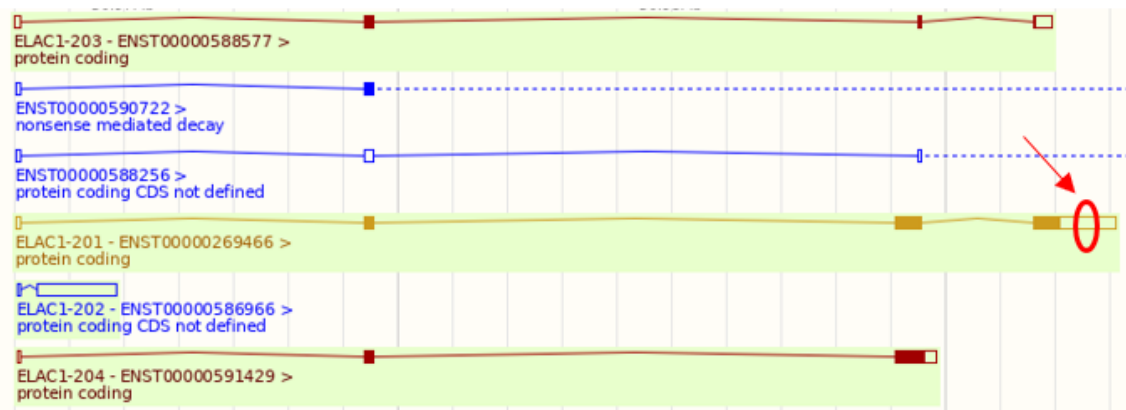




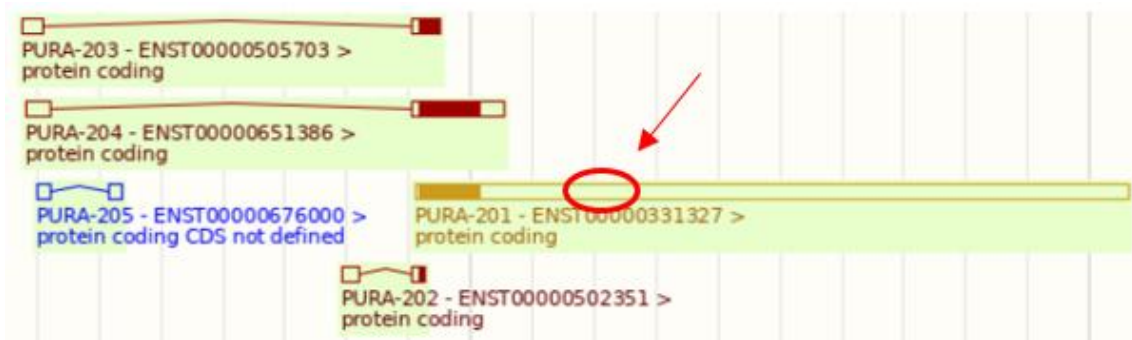
RPL15-210, continuación

Anexo III

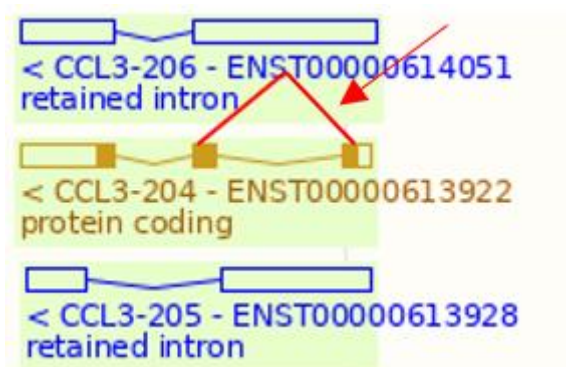
ELAC1-201



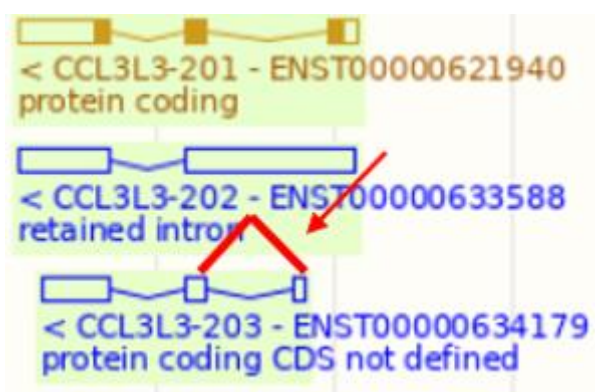
PURA-201



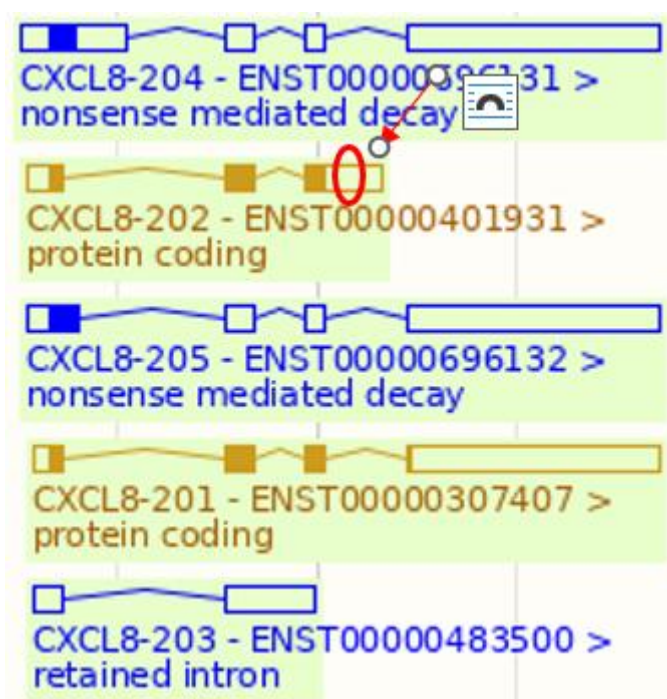
CCL3-204



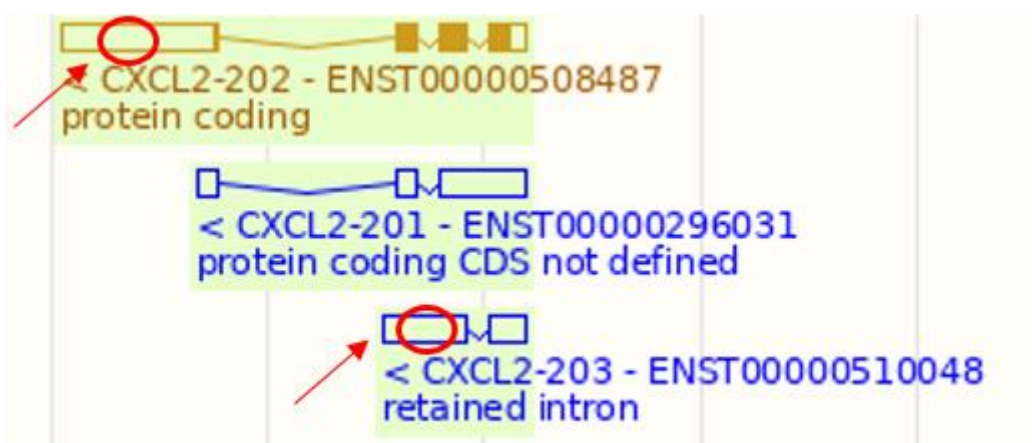
CCL3L3-203



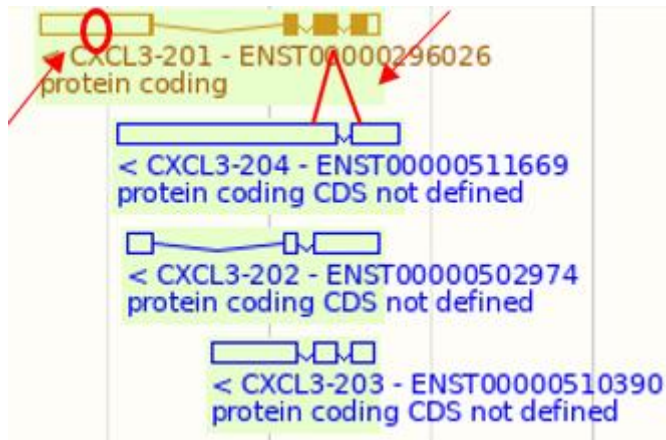
CXCL8-202



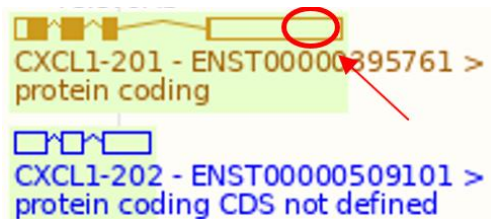
CXCL2-202, CXCL2-203



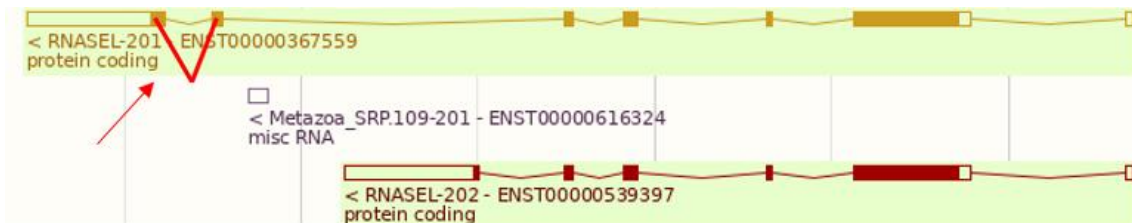
CXCL3-201, CXCL3-204



CXCL1-201



RNASEL-201





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelhak, A., Hottenrott, T., Morenas-Rodríguez, E., Suárez-Calvet, M., Zettl, U. K., Haass, C., Meuth, S. G., Rauer, S., Otto, M., Tumani, H., & Huss, A. (2019). Glial Activation Markers in CSF and Serum From Patients With Primary Progressive Multiple Sclerosis: Potential of Serum GFAP as Disease Severity Marker? *Frontiers in Neurology*, *10*, 448013. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2019.00280/BIBTEX>
- Abdelhak, A., Huss, A., Kassubek, J., Tumani, H., & Otto, M. (2018). Serum GFAP as a biomarker for disease severity in multiple sclerosis. *Scientific Reports* *2018* *8*:1, *8*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33158-8>
- Aeinehband, S., Lindblom, R. P. F., Nimer, F. Al, Vijayaraghavan, S., Sandholm, K., Khademi, M., Olsson, T., Nilsson, B., Ekdahl, K. N., Darreh-Shori, T., & Piehl, F. (2015). Complement Component C3 and Butyrylcholinesterase Activity Are Associated with Neurodegeneration and Clinical Disability in Multiple Sclerosis. *PLOS ONE*, *10*(4), e0122048. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0122048>
- Agah, E., Zardoui, A., Saghazadeh, A., Ahmadi, M., Tafakhori, A., & Rezaei, N. (2018). Osteopontin (OPN) as a CSF and blood biomarker for multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, *13*(1), e0190252. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0190252>
- Agliardi, C., Guerini, F. R., Zanzottera, M., Bolognesi, E., Picciolini, S., Caputo, D., Rovaris, M., Pasanisi, M. B., & Clerici, M. (2023). Myelin Basic Protein in Oligodendrocyte-Derived Extracellular Vesicles as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Multiple Sclerosis: A Pilot Study. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(1), 894. <https://doi.org/10.3390/IJMS24010894>
- Ahola, V., Saraste, M., Nylund, M., Matilainen, M., Luoma, A., Vuorimaa, A., Lehto, J., Laaksonen, S., Brockmann, E. C., Kuhle, J., Leppert, D., Soukka, T., Lamminmäki, U., & Airas, L. (2025). Plasma CHI3L1 associates with brain volume loss and glial activation in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *96*(11), 1056–1060. <https://doi.org/10.1136/JNNP-2025-336063>
- Albelo-Martínez, M., & Rizvi, S. (2025). Progressive multiple sclerosis: Evaluating current therapies and exploring future treatment strategies. *Neurotherapeutics*, *4*(22), e00601. <https://doi.org/10.1016/j.neurot.2025.e00601>
- Aliaga-Gaspar, P., Hurtado-Guerrero, I., Ciano-Petersen, N. L., Urbaneja, P., Brichette-Mieg, I., Reyes, V., Rodríguez-Bada, J. L., Alvarez-Lafuente, R., Arroyo, R., Quintana, E., Ramió-Torrentà, L., Alonso, A., Leyva, L., Fernández, O., & Oliver-Martos, B. (2021). Soluble Receptor Isoform of IFN-Beta (sIFNAR2) in Multiple Sclerosis Patients and Their Association With the Clinical Response to IFN-Beta Treatment. *Frontiers in Immunology*, *12*, 778204. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.778204>
- Alkhazaali-Ali, Z., Sahab-Negah, S., Boroumand, A. R., & Tavakol-Afshari, J. (2024). MicroRNA (miRNA) as a biomarker for diagnosis, prognosis, and therapeutics molecules in

- neurodegenerative disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 177, 116899.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2024.116899>
- Álvarez-Cermeño J.C., & Villar L.M. (2013). Multiple sclerosis: Oligoclonal bands—a useful tool to avoid MS misdiagnosis. *Nature Publishing Group*, 9, 303–304.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.74>
- Axelsson, M., Malmeström, • C, Nilsson, • S, Haghighi, • S, Rosengren, • L, & Lycke, • J. (2011). *Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis*. 258(5), 882–888. <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5863-2>
- Ayrignac, X., Le Bars, E., Duflos, C., Hirtz, C., Maleska Maceski, A., Carra-Dallièrè, C., Charif, M., Pinna, F., Prin, P., Menjot de Champfleure, N., Deverdun, J., Kober, T., Marechal, B., Fartaria, M. J., Corredor Jerez, R., Labauge, P., & Lehmann, S. (2020). Serum GFAP in multiple sclerosis: correlation with disease type and MRI markers of disease severity. *Scientific Reports*, 10(1), 10923. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-67934-2>
- Baaklini, C. S., Ho, M. F. S., Lange, T., Hammond, B. P., Panda, S. P., Zirngibl, M., Zia, S., Himmelsbach, K., Rana, H., Phillips, B., Antoszko, D., Ibanga, J., Lopez, M., Lee, K. V., Keough, M. B., Caprariello, A. V., Kerr, B. J., & Plemel, J. R. (2023). Microglia promote remyelination independent of their role in clearing myelin debris. *Cell Reports*, 42(12), 113574. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2023.113574>
- Babiyak, M. A. (2004). What you see may not be what you get: A brief, nontechnical introduction to overfitting in regression-type models. *Psychosomatic Medicine*, 66(3), 411–421. <https://doi.org/10.1097/01.PSY.0000127692.23278.A9>
- Balcerac, A., & Louapre, C. (2022). Genetics and familial distribution of multiple sclerosis: A review. *Revue Neurologique*, 178(6), 512–520.
<https://doi.org/10.1016/j.neurol.2021.11.009>
- Baranzini, S. E., Mudge, J., Van Velkinburgh, J. C., Khankhanian, P., Khrebtukova, I., Miller, N. A., Zhang, L., Farmer, A. D., Bell, C. J., Kim, R. W., May, G. D., Woodward, J. E., Caillier, S. J., McElroy, J. P., Gomez, R., Pando, M. J., Clendenen, L. E., Ganusova, E. E., Schilkey, F. D., ... Kingsmore, S. F. (2010). Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature*, 464(7293), 1351–1356.
<https://doi.org/10.1038/nature08990>
- Barbuti, E., Piervincenzi, C., Ruggieri, S., & Petracca, M. (2025). Sex-Related Differences in Lifestyle Factors Affecting Multiple Sclerosis Susceptibility and Disease Progression. *Brain Sciences*, 15(10). <https://doi.org/10.3390/BRAINS15101097>
- Barclay, W., & Shinohara, M. L. (2017). Inflammasome activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Brain Pathology*, 27(2), 213–219.
<https://doi.org/10.1111/BPA.12477>
- Bar-Or, A., Fawaz, L., Fan, B., Darlington, P. J., Rieger, A., Ghorayeb, C., Calabresi, P. A., Waubant, E., Hauser, S. L., Zhang, J., & Smith, C. H. (2010). Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Annals of Neurology*, 67(4), 452–461. <https://doi.org/10.1002/ANA.21939>
- Barrero Hernández, F. J., Romero Villarrubia, A., Muñoz Fernández, C., Guillén Martínez, V., Aguilera Del Moral, A., Barrios-López, J. M., Ramírez Rivas, M. A., Gálvez Muñoz, A. J., &

- Piñar Morales, R. (2024). Real-World Study of Serum Neurofilament Light Chain Levels in Ocrelizumab-Treated People with Relapsing Multiple Sclerosis. *Journal of Personalized Medicine*, 14(7), 692. <https://doi.org/10.3390/JPM14070692>
- Barro, C., Healy, B. C., Liu, Y., Saxena, S., Paul, A., Polgar-Turcsanyi, M., Guttman, C. R. G., Bakshi, R., Kropshofer, H., Weiner, H. L., & Chitnis, T. (2022). Serum GFAP and NfL Levels Differentiate Subsequent Progression and Disease Activity in Patients With Progressive Multiple Sclerosis. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 10(1), e200052. <https://doi.org/10.1212/NXI.000000000200052>
- Benkert, P., Meier, S., Schaedelin, S., Manouchehrinia, A., Yaldizli, Ö., Maceski, A., Oechtering, J., Achtnichts, L., Conen, D., Derfuss, T., Lalive, P. H., Mueller, C., Müller, S., Naegelin, Y., Oksenberg, J. R., Pot, C., Salmen, A., Willemse, E., Kockum, I., ... Zecca, C. (2022). Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *The Lancet. Neurology*, 21(3), 246–257. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00009-6)
- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375(6578), 296–301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>
- Bonnan, M. (2015). Intrathecal IgG synthesis: a resistant and valuable target for future multiple sclerosis treatments. *Multiple Sclerosis International*, 2015, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2015/296184>
- Bonneh-Barkay, D., Wang, G., Starkey, A., Hamilton, R. L., & Wiley, C. A. (2010). In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 34. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-34>
- Bose, A., Khalighinejad, F., Hoaglin, D. C., & Hemond, C. C. (2024). Evaluating the Clinical Utility of Epstein-Barr Virus Antibodies as Biomarkers in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 84, 105410. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2023.105410>
- Bravo-Miana, R. del C., Arizaga-Echebarria, J. K., & Otaegui, D. (2024). Central nervous system-derived extracellular vesicles: the next generation of neural circulating biomarkers? *Translational Neurodegeneration*, 13(1), 32. <https://doi.org/10.1186/S40035-024-00418-9>
- Brownlee, W. J., Hardy, T. A., Fazekas, F., & Miller, D. H. (2017). Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *The Lancet*, 389(10076), 1336–1346. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30959-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30959-X)
- Bustin, S. A., Ruijter, J. M., van den Hoff, M. J. B., Kubista, M., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Tran, N., Rödiger, S., Untergasser, A., Mueller, R., Nolan, T., Milavec, M., Burns, M. J., Huggett, J. F., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2025). MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clinical Chemistry*, 71(6), 634–651. <https://doi.org/10.1093/CLINCHEM/HVAF043>
- Cabrera, C. M. (2022). Oligoclonal bands: An immunological and clinical approach. *Advances in Clinical Chemistry*, 109, 129–163. <https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2022.03.004>

- Camu, W., Leheret, P., Pierrot-Deseilligny, C., Hautecoeur, P., Besserve, A., Deleglise, A. S. J., Payet, M., Thouvenot, E., & Souberbielle, J. C. (2019). Cholecalciferol in relapsing-remitting MS: A randomized clinical trial (CHOLINE). *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 6(5), e597. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000597>
- Canto, E., Tintore, M., Villar, L. M., Costa, C., Nurtadinov, R., Alvarez-Cermeno, J. C., Arrambide, G., Reverter, F., Deisenhammer, F., Hegen, H., Khademi, M., Olsson, T., Tumani, H., Rodriguez-Martin, E., Piehl, F., Bartos, A., Zimova, D., Kotoucova, J., Kuhle, J., ... Comabella, M. (2015). Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain : A Journal of Neurology*, 138(Pt 4), 918–931. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWV017>
- Capuano, R., Zubizarreta, I., Alba-Arbalat, S., Sepulveda, M., Sola-Valls, N., Pulido-Valdeolivas, I., Andorra, M., Martinez-Heras, E., Solana, E., Lopez-Soley, E., Montejo, C., Blanco, Y., Fernández-Velasco, J. I., Gallo, A., Bisecco, A., Villoslada, P., Saiz, A., Llufríu, S., Villar, L. M., & Martinez-Lapiscina, E. H. (2021). Oligoclonal IgM bands in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing MS to inform long-term MS disability. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 27(11), 1706–1716. <https://doi.org/10.1177/1352458520981910>
- Cardamone, G., Paraboschi, E. M., Rimoldi, V., Duga, S., Soldà, G., & Asselta, R. (2017). The characterization of GSDMB splicing and backsplicing profiles identifies novel isoforms and a circular RNA that are dysregulated in multiple sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 576. <https://doi.org/10.3390/ijms18030576>
- Cassard, S. D., Fitzgerald, K. C., Qian, P., Emrich, S. A., Azevedo, C. J., Goodman, A. D., Sugar, E. A., Pelletier, D., Waubant, E., & Mowry, E. M. (2023). High-dose vitamin D3 supplementation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised clinical trial. *EClinicalMedicine*, 59, 101957. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.101957>
- Chakrabarti, A., Jha, B. K., & Silverman, R. H. (2011). New insights into the role of RNase L in innate immunity. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 31(1), 49–57. <https://doi.org/10.1089/JIR.2010.0120>
- Charabati, M., Wheeler, M. A., Weiner, H. L., & Quintana, F. J. (2023). Multiple sclerosis: Neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting. *Cell*, 186(7), 1309–1327. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2023.03.008>
- Chase Huizar, C., Raphael, I., & Forsthuber, T. G. (2020). Genomic, proteomic, and systems biology approaches in biomarker discovery for multiple sclerosis. *Cellular Immunology*, 358, 104219. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2020.104219>
- Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K., & Fisher, A. B. (2000). 1-Cys Peroxiredoxin, a Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A2 Activities. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 28421–28427. <https://doi.org/10.1074/JBC.M005073200>
- Chitnis, T., Magliozzi, R., Abdelhak, A., Kuhle, J., Leppert, D., & Bielekova, B. (2025). Blood and CSF biomarkers for multiple sclerosis: emerging clinical applications. *The Lancet Neurology*, 24, 1066–1078. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(25\)00249-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(25)00249-2)

- Chu, A. B., Sever, J. L., Madden, D. L., Iivanainen, M., Leon, M., Wallen, W., Brooks, B. R., Lee, Y. J., & Houff, S. (1983). Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid in various neurological diseases. *Annals of Neurology*, 13(4), 434–439. <https://doi.org/10.1002/ANA.410130410>
- Chuluuundorj, D., Harding, S. A., Abernethy, D., & La Flamme, A. C. (2014). Expansion and preferential activation of the CD14(+)CD16(+) monocyte subset during multiple sclerosis. *Immunology and Cell Biology*, 92(6), 509–517. <https://doi.org/10.1038/ICB.2014.15>
- Comabella, M., Fernández, M., Martín, R., Rivera-Vallvé, S., Borrás, E., Chiva, C., Juli, E., Rovira, A., Cantó, E., Álvarez-Cermeño, J. C., Villar, L. M., Tintoré, M., & Montalban, X. (2010). Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain*, 133(4), 1082–1093. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWQ035>
- Comabella, M., & Montalban, X. (2014). Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 13(1), 113–126. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70233-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70233-3)
- Comi, G., Bar-Or, A., Lassmann, H., Uccelli, A., Hartung, H. P., Montalban, X., Sørensen, P. S., Hohlfeld, R., & Hauser, S. L. (2021). Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Annals of Neurology*, 89(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/ANA.25927>
- Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *The Lancet*, 372(9648), 1502–1517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7)
- Corradu, F., Reyes-Yanez, M. P., Parra, A., Gray, J., Smith, S. I., Taylor, C. J., & Compston, D. A. S. (1998). HLA associations with multiple sclerosis in the Canary Islands. *Journal of Neuroimmunology*, 87(1–2), 130–135. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00074-5)
- Correale, J., & Marrodan, M. (2022). Multiple sclerosis and obesity: The role of adipokines. *Frontiers in Immunology*, 13, 1038393. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.1038393/XML>
- Cui, Y., Yu, H., Bu, Z., Wen, L., Yan, L., & Feng, J. (2022). Focus on the Role of the NLRP3 Inflammasome in Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 894298. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.894298>
- Cuomo-Haymour, N., Bergamini, G., Russo, G., Kulic, L., Knuesel, I., Martín, R., Huss, A., Tumani, H., Otto, M., & Pryce, C. R. (2022). Differential Expression of Serum Extracellular Vesicle miRNAs in Multiple Sclerosis: Disease-Stage Specificity and Relevance to Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1664. <https://doi.org/10.3390/IJMS23031664>
- Daniel, D. C., & Johnson, E. M. (2018). PURA, the gene encoding Pur-alpha, member of an ancient nucleic acid-binding protein family with mammalian neurological functions. *Gene*, 643, 133–143. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2017.12.004>
- Del Boccio, P., Rossi, C., di Iorio, M., Cicalini, I., Sacchetta, P., & Pieragostino, D. (2016). Integration of metabolomics and proteomics in multiple sclerosis: From biomarkers discovery to personalized medicine. *Proteomics - Clinical Applications*, 10(4), 470–484. <https://doi.org/10.1002/PRCA.201500083>
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews. Immunology*, 15(9), 545–558. <https://doi.org/10.1038/NRI3871>

- Deng, J., Yu, X. Q., & Wang, P. H. (2019). Inflammasome activation and Th17 responses. *Molecular Immunology*, 107, 142–164. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.024>
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, 281(1), 8–27. <https://doi.org/10.1111/IMR.12621>,
- DiSano, K. D., Gilli, F., & Pachner, A. R. (2020). Intrathecally produced CXCL13: A predictive biomarker in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical*, 6(4), 2055217320981396. https://doi.org/10.1177_2055217320981396
- Disanto, G., Barro, C., Benkert, P., Naegelin, Y., Schädelin, S., Giardiello, A., Zecca, C., Blennow, K., Zetterberg, H., Leppert, D., Kappos, L., Gobbi, C., & Kuhle, J. (2017). Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 81(6), 857–870. <https://doi.org/10.1002/ANA.24954>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635>
- Dolati, S., Babaloo, Z., Jadidi-Niaragh, F., Ayromlou, H., Sadreddini, S., & Yousefi, M. (2017). Multiple sclerosis: Therapeutic applications of advancing drug delivery systems. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 343–353. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.12.010>
- Dörr, J., Bäcker-Koduah, P., Wernecke, K. D., Becker, E., Hoffmann, F., Faiss, J., Brockmeier, B., Hoffmann, O., Anvari, K., Wuerfel, J., Piper, S. K., Bellmann-Strobl, J., Brandt, A. U., & Paul, F. (2020). High-dose vitamin D supplementation in multiple sclerosis - results from the randomized EVIDIMS (efficacy of vitamin D supplementation in multiple sclerosis) trial. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical*, 6(1), 2055217320903474. <https://doi.org/10.1177/2055217320903474>
- Du, X., Shi, H., Li, J., Dong, Y., Liang, J., Ye, J., Kong, S., Zhang, S., Zhong, T., Yuan, Z., Xu, T., Zhuang, Y., Zheng, B., Geng, J.-G., & Tao, W. (2014). Mst1/Mst2 regulate development and function of regulatory T cells through modulation of Foxo1/Foxo3 stability in autoimmune disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(4), 1525–1535. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1301060>
- Feige, J., Moser, T., Bieler, L., Schwenker, K., Hauer, L., & Sellner, J. (2020). *Vitamin D Supplementation in Multiple Sclerosis: A Critical Analysis of Potentials and Threats*. 12(3), 783. <https://doi.org/10.3390/nu12030783>
- Fernández, O., Fernández E., V., & Guerrero, M. (2011). *Esclerosis Múltiple* (Momento Medico S.r.l., Ed.; Tercera Edición).
- Fernández, O., Fernández, V., Martínez-Cabrera, V., Mayorga, C., Alonso, A., León, A., Arnal, C., Hens, M., Luque, G., De Ramón, E., Caballero, A., & Leyva, L. (2008). Multiple sclerosis in Gypsies from southern Spain: prevalence, mitochondrial DNA haplogroups and HLA class II association. *Tissue Antigens*, 71(5), 426–433. <https://doi.org/10.1111/J.1399-0039.2008.01016.X>
- Ferrandi, C., Richard, F., Tavano, P., Hauben, E., Barbié, V., Gotteland, J.-P., Greco, B., Fortunato, M., Mariani, M. F., Furlan, R., Comi, G., Martino, G., & Zaratini, P. F. (n.d.). Characterization of immune cell subsets during the active phase of multiple sclerosis

- reveals disease and c-Jun N-terminal kinase pathway biomarkers. *Research Paper Multiple Sclerosis Journal*, 17(1), 43–56. <https://doi.org/10.1177/1352458510381258>
- Filippi, M., Preziosa, P., Meani, A., Ciccarelli, O., Mesaros, S., Rovira, A., Frederiksen, J., Enzinger, C., Barkhof, F., Gasperini, C., Brownlee, W., Drulovic, J., Montalban, X., Cramer, S. P., Pichler, A., Hagens, M., Ruggieri, S., Martinelli, V., Miszkiel, K., ... Rocca, M. A. (2018). Prediction of a multiple sclerosis diagnosis in patients with clinically isolated syndrome using the 2016 MAGNIMS and 2010 McDonald criteria: a retrospective study. *The Lancet Neurology*, 17(2), 133–142. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30469-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30469-6)
- Fissolo, N., Benkert, P., Sastre-Garriga, J., Mongay-Ochoa, N., Vilaseca-Jolonch, A., Llufríu, S., Blanco, Y., Hegen, H., Berek, K., Perez-Miralles, F., Rejdak, K., Villar, L. M., Monreal, E., Alvarez-Lafuente, R., Soylu, O. K., Abdelhak, A., Bachhuber, F., Tumani, H., Martínez-Yélamos, S., ... Comabella, M. (2023). Serum biomarker levels predict disability progression in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 5(95), 410–418. <https://doi.org/10.1136/JNNP-2023-332251>
- Fissolo, N., Pappolla, A., Rio, J., Villar, L. M., Perez-Hoyos, S., Sanchez, A., Gutierrez, L., Montalban, X., & Comabella, M. (2022). Serum Levels of CXCL13 Are Associated With Teriflunomide Response in Patients With Multiple Sclerosis. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 10(1). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000200050>
- Fitzner, B., Hecker, M., & Zettl, U. K. (2015). Molecular biomarkers in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 14, Issue 10, pp. 903–913). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.06.001>
- Flanagan, E. P., Cabre, P., Weinshenker, B. G., Sauver, J. S., Jacobson, D. J., Majed, M., Lennon, V. A., Lucchinetti, C. F., McKeon, A., Matiello, M., Kale, N., Wingerchuk, D. M., Mandrekar, J., Sagen, J. A., Fryer, J. P., Robinson, A. B., & Pittock, S. J. (2016). Epidemiology of aquaporin-4 autoimmunity and neuromyelitis optica spectrum. *Annals of Neurology*, 79(5), 775–783. <https://doi.org/10.1002/ANA.24617>
- Floro, S., Carandini, T., Pietroboni, A. M., De Riz, M. A., Scarpini, E., & Galimberti, D. (2022). Role of Chitinase 3-like 1 as a Biomarker in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 9(4), e1164. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001164>
- Fluss, R., Faraggi, D., & Reiser, B. (2005). Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point. *Biometrical Journal*, 47(4), 458–472. <https://doi.org/10.1002/BIMJ.200410135>
- Franklin, R. J. M., & Ffrench-Constant, C. (2017). Regenerating CNS myelin — from mechanisms to experimental medicines. *Nature Reviews Neuroscience* 2017 18:12, 18(12), 753–769. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.136>
- Fransen, N. L., Hsiao, C. C., Van Der Poel, M., Engelenburg, H. J., Verdaasdonk, K., Vincenten, M. C. J., Remmerswaal, E. B. M., Kuhlmann, T., Mason, M. R. J., Hamann, J., Smolders, J., & Huitinga, I. (2020). Tissue-resident memory T cells invade the brain parenchyma in multiple sclerosis white matter lesions. *Brain : A Journal of Neurology*, 143(6), 1714–1730. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAA117>

- Freedman, M. S., Comi, G., De Stefano, N., Barkhof, F., Polman, C. H., Uitdehaag, B. M. J., Lehr, L., Stubinski, B., & Kappos, L. (2014). Moving toward earlier treatment of multiple sclerosis: Findings from a decade of clinical trials and implications for clinical practice. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 3(2), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2013.07.001>
- Galarza-Muñoz, G., Briggs, F. B. S., Evsyukova, I., Schott-Lerner, G., Kennedy, E. M., Nyanhete, T., Wang, L., Bergamaschi, L., Widen, S. G., Tomaras, G. D., Ko, D. C., Bradrick, S. S., Barcellos, L. F., Gregory, S. G., & Garcia-Blanco, M. A. (2017). Human Epistatic Interaction Controls IL7R Splicing and Increases Multiple Sclerosis Risk. *Cell*, 169(1), 72-84.e13. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.03.007>
- Galarza-Muñoz, G., Kennedy-Boone, D., Schott, G., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2022). Antisense modulation of IL7R splicing to control sIL7R expression in human CD4+ T cells. *RNA (New York, N.Y.)*, 28(8), 1058–1073. <https://doi.org/10.1261/RNA.079137.122>
- Gao, Y., Han, D., & Feng, J. (2021). MicroRNA in multiple sclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 516, 92–99. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2021.01.020>
- García López, F. J., García-Merino, A., Alcalde-Cabero, E., & de Pedro-Cuesta, J. (2022). Incidencia y prevalencia de la esclerosis múltiple en España. Una revisión sistemática. *Neurología*, 39(8), 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2022.02.006>
- García-Tortosa, C., Amrani, Y., Casado-Torres, A., Muñoz, F. J., & Vázquez, J. (1998). Niveles en suero de ICAM-I soluble en pacientes con esclerosis múltiple. *Revista de Neurología* 1998, 26(154), 926-929, 26(154), 926–929. <https://doi.org/10.33588/RN.26154.98059>
- Geladaris, A., Häusler, D., & Weber, M. S. (2021). Microglia: The Missing Link to Decipher and Therapeutically Control MS Progression? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3461. <https://doi.org/10.3390/IJMS22073461>
- Geraci, F., Ragonese, P., Barreca, M. M., Aliotta, E., Mazzola, M. A., Realmuto, S., Vazzoler, G., Savettieri, G., Sconzo, G., & Salemi, G. (2018). Differences in Intercellular Communication During Clinical Relapse and Gadolinium-Enhanced MRI in Patients With Relapsing Remitting Multiple Sclerosis: A Study of the Composition of Extracellular Vesicles in Cerebrospinal Fluid. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 418. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00418>
- Geyer, P. E., Holdt, L. M., Teupser, D., & Mann, M. (2017). Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular Systems Biology*, 13(9), 942. <https://doi.org/10.15252/MSB.20156297>
- Gill, A. J., Schorr, E. M., Gadani, S. P., & Calabresi, P. A. (2023). Emerging imaging and liquid biomarkers in multiple sclerosis. *European Journal of Immunology*, 8(53), e2250228. <https://doi.org/10.1002/eji.202250228>
- Gjelstrup, M. C., Stilund, M., Petersen, T., Møller, H. J., Petersen, E. L., & Christensen, T. (2018). Subsets of activated monocytes and markers of inflammation in incipient and progressed multiple sclerosis. *Immunology and Cell Biology*, 96(2), 160–174. <https://doi.org/10.1111/IMCB.1025>

- Grazyna Galazka, Marcin P Mycko, Igor Selmaj, Cedric S Raine, and K. W. S. (2018). Multiple sclerosis: Serum-derived exosomes express myelin proteins. *Multiple Sclerosis Journal*, 24(4), 449–458. <https://doi.org/10.1177/1352458517696597>
- Gregory, A. P., Dendrou, C. A., Attfield, K. E., Haghighi, A., Xifara, D. K., Butter, F., Poschmann, G., Kaur, G., Lambert, L., Leach, O. A., Prömel, S., Punwani, D., Felce, J. H., Davis, S. J., Gold, R., Nielsen, F. C., Siegel, R. M., Mann, M., Bell, J. I., ... Fugger, L. (2012). TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature*, 488(7412), 508–511. <https://doi.org/10.1038/nature11307>
- Hafler, D. A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E. S., Daly, M. J., De Jager, P. L., de Bakker, P. I., Gabriel, S. B., Mirel, D. B., Iverson, A. J., Pericak-Vance, M. A., Gregory, S. G., Rioux, J. D., McCauley, J. L., Haines, J. L., Barcellos, L. F., Cree, B., Oksenberg, J. R., & Hauser, S. L. (2007). Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *N Engl J Med*, 357, 851–862. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa073493>
- Hales, C. M., Dammer, E. B., Diner, I., Yi, H., Seyfried, N. T., Gearing, M., Glass, J. D., Montine, T. J., Levey, A. I., & Lah, J. J. (2014). Aggregates of Small Nuclear Ribonucleic Acids (snRNAs) in Alzheimer's Disease. *Brain Pathology*, 24(4), 344–351. <https://doi.org/10.1111/BPA.12133/SUPINFO>
- Harbo, H. F., Gold, R., & Tintora, M. (2013). Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6(4), 237. <https://doi.org/10.1177/1756285613488434>
- Hares, K., Kemp, K., Loveless, S., Rice, C. M., Scolding, N., Tallantyre, E., Robertson, N., & Wilkins, A. (2021). KIF5A and the contribution of susceptibility genotypes as a predictive biomarker for multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 268(6), 2175. <https://doi.org/10.1007/S00415-020-10373-W>
- Haschka, D., Tymoszyk, P., Bsteh, G., Petzer, V., Berek, K., Theurl, I., Berger, T., & Weiss, G. (2020). Expansion of Neutrophils and Classical and Nonclassical Monocytes as a Hallmark in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 11, 594. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00594>
- Hassanzad, M., & Hajian-Tilaki, K. (2024). Methods of determining optimal cut-point of diagnostic biomarkers with application of clinical data in ROC analysis: an update review. *BMC Medical Research Methodology* 2024 24:1, 24(1), 84. <https://doi.org/10.1186/S12874-024-02198-2>
- Heim, X., Joshkon, A., Bermudez, J., Bachelier, R., Dubrou, C., Boucraut, J., Foucault-Bertaud, A., Leroyer, A. S., Dignat-George, F., Blot-Chabaud, M., & Bardin, N. (2020). CD146/sCD146 in the Pathogenesis and Monitoring of Angiogenic and Inflammatory Diseases. *Biomedicines* 2020, Vol. 8, Page 592, 8(12), 592. <https://doi.org/10.3390/BIMEDICINES8120592>
- Hillert, J. (1994). Human leukocyte antigen studies in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 36 Suppl, S15–S17. <https://doi.org/10.1002/ANA.410360706>
- Hirano, M., Galarza-Muñoz, G., Nagasawa, C., Schott, G., Wang, L., Antonia, A. L., Jain, V., Yu, X., Widen, S. G., Briggs, F. B. S., Gregory, S. G., Ko, D. C., Fagg, W. S., Bradrick, S., & Garcia-

- Blanco, M. A. (2023). The RNA helicase DDX39B activates FOXP3 RNA splicing to control T regulatory cell fate. *ELife*, 12, 76927. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.76927>
- Högel, H., Rissanen, E., Barro, C., Matilainen, M., Nylund, M., Kuhle, J., & Airas, L. (2020). Serum glial fibrillary acidic protein correlates with multiple sclerosis disease severity. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 26(2), 210–219. <https://doi.org/10.1177/1352458518819380>
- Hokkanen, S., Feldmann, H. M., Ding, H., Jung, C. K. E., Bojarski, L., Iler, I. R. M., Schüller, U., Kretzschmar, H., Wolf, E., & Herms, J. (2012). Lack of Pur-alpha alters postnatal brain development and causes megalencephaly. *Human Molecular Genetics*, 21(3), 473–484. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDR476>
- Huang, L., Liu, M., Jiang, W., Ding, H., Han, Y., Wen, M., Li, Y., Liu, X., & Zeng, H. (2022). Bradykinin/bradykinin 1 receptor promotes brain microvascular endothelial cell permeability and proinflammatory cytokine release by downregulating Wnt3a. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(12), e23213. <https://doi.org/10.1002/JBT.23213>
- Hupperts, R., Smolders, J., Vieth, R., Holmøy, T., Marhardt, K., Schlupe, M., Killestein, J., Barkhof, F., Beelke, M., & Grimaldi, L. M. E. (2019). Randomized trial of daily high-dose vitamin D3 in patients with RRMS receiving subcutaneous interferon β -1a. *Neurology*, 93(20), E1906–E1916. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008445>
- Hurtado-Guerrero, I., Hernández, B., Pinto-Medel, M. J., Calonge, E., Rodríguez-Bada, J. L., Urbaneja, P., Alonso, A., Mena-Vázquez, N., Aliaga, P., Issazadeh-Navikas, S., Pavia, J., Leyva, L., Alcamí, J., Alcamí, A., Fernández, Ó., & Oliver-Martos, B. (2020). Antiviral, Immunomodulatory and Antiproliferative Activities of Recombinant Soluble IFNAR2 without IFN- β Mediation. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), 959. <https://doi.org/10.3390/JCM9040959>
- Huss, A., Otto, M., Senel, M., Ludolph, A. C., Abdelhak, A., & Tumani, H. (2020). A Score Based on NfL and Glial Markers May Differentiate Between Relapsing-Remitting and Progressive MS Course. *Frontiers in Neurology*, 11, 608. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2020.00608>
- Ian McDonald, W., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.-P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B. Y., & Wolinsky, J. S. (2001). Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*, 50, 121–127. <https://doi.org/10.1002/ana.1032>
- IN, M., Dutta, N., Patil, H., Mamadapur, M., Guruswamy, V. A., & M R, P. K. (2025). Sexual Dysfunction in Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases: Prevalence, Impact, and Management Strategies. *Mediterranean Journal of Rheumatology*, 36(3), 466. <https://doi.org/10.31138/MJR.170225.IAP>
- Inojosa, H., Proschmann, U., Akgün, K., & Ziemssen, T. (2021). A focus on secondary progressive multiple sclerosis (SPMS): challenges in diagnosis and definition. *Journal of Neurology*, 268(4), 1210–1221. <https://doi.org/10.1007/S00415-019-09489-5>

- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. (2023). Locus for severity implicates CNS resilience in progression of multiple sclerosis. *Nature*, 619(7969), 323–331. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06250-x>
- Ipavec, N., Rogić Vidaković, M., Markotić, A., Pavelin, S., Buljubašić Šoda, M., Šoda, J., Dolić, K., & Režić Mužinić, N. (2024). Treated and Untreated Primary Progressive Multiple Sclerosis: Walkthrough Immunological Changes of Monocytes and T Regulatory Cells. *Biomedicines*, 12(2), 464. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES12020464>
- Jacobs, B. M., Vickaryous, N., Giovannoni, G., Proitsi, P., Waters, S., & Dobson, R. (2024). Plasma proteomic profiles of UK Biobank participants with multiple sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 11(3), 698–709. <https://doi.org/10.1002/ACN3.51990>
- Jasper, E. A., Nidey, N. L., Schweizer, M. L., & Ryckman, K. K. (2020). Gestational vitamin D and offspring risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Epidemiology*, 43, 11–17. <https://doi.org/10.1016/J.ANNEPIDEM.2019.12.010>
- Jing, Y., Ni, Z., Wu, J., Higgins, L. A., Markowski, T. W., Kaufman, D. S., & Walcheck, B. (2015). Identification of an ADAM17 cleavage region in human CD16 (FcγRIII) and the engineering of a non-cleavable version of the receptor in NK cells. *PLoS One*, 10(3), e0121788. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0121788>
- Kaisho, T., Ishikawa, J., Oritani, K., Inazawa, J., Tomizawa, H., Muraoka, O., Ochi, T., & Hirano, T. (1994). BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5325–5329. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.12.5325>
- Kamma, E., Lasisi, W., Libner, C., Ng, H. S., & Plemel, J. R. (2022). Central nervous system macrophages in progressive multiple sclerosis: relationship to neurodegeneration and therapeutics. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 45. <https://doi.org/10.1186/S12974-022-02408-Y>
- Kapoor, R., Ho, P. R., Campbell, N., Chang, I., Deykin, A., Forrestal, F., Lucas, N., Yu, B., Arnold, D. L., Freedman, M. S., Goldman, M. D., Hartung, H. P., Havrdová, E. K., Jeffery, D., Miller, A., Sellebjerg, F., Cadavid, D., Mikol, D., Steiner, D., ... Zarelli, G. (2018). Effect of natalizumab on disease progression in secondary progressive multiple sclerosis (ASCEND): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with an open-label extension. *The Lancet Neurology*, 17(5), 405–415. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30069-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30069-3)
- Kappos, L., Wolinsky, J. S., Giovannoni, G., Arnold, D. L., Wang, Q., Bernasconi, C., Model, F., Koendgen, H., Manfrini, M., Belachew, S., & Hauser, S. L. (2020). Contribution of Relapse-Independent Progression vs Relapse-Associated Worsening to Overall Confirmed Disability Accumulation in Typical Relapsing Multiple Sclerosis in a Pooled Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurology*, 77(9), 1132–1140. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2020.1568>
- Karaaslan, Z., Kurtuncu, M., Akcay, H. İ., Gunduz, T., Altunrende, B., Turkoglu, R., Eraksoy, M., Ulusoy, C., Yilmaz, V., & Tüzün, E. (2022). CXCL13 Levels Indicate Treatment Responsiveness to Fingolimod in MS Patients. *European Neurology*, 85(1), 69–71. <https://doi.org/10.1159/000517770>

- Keane, R. W., Dietrich, W. D., & de Rivero Vaccari, J. P. (2018). Inflammasome proteins as biomarkers of multiple sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 9, 135. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00135>
- Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 13, p. 3328). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Khalil, M., Teunissen, C. E., Lehmann, S., Otto, M., Piehl, F., Ziemssen, T., Bittner, S., Sormani, M. P., Gatteringer, T., Abu-Rumeileh, S., Thebault, S., Abdelhak, A., Green, A., Benkert, P., Kappos, L., Comabella, M., Tumani, H., Freedman, M. S., Petzold, A., ... Kuhle, J. (2024). Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders - towards clinical application. *Nature Reviews. Neurology*, 20(5), 269–287. <https://doi.org/10.1038/S41582-024-00955-X>
- Khan, A. W., Farooq, M., Hwang, M. J., Haseeb, M., & Choi, S. (2023). Autoimmune Neuroinflammatory Diseases: Role of Interleukins. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 7960. <https://doi.org/10.3390/IJMS24097960>
- Khani, L., Jazayeri, M. H., Nedaeinia, R., Bozorgmehr, M., Nabavi, S. M., & Ferns, G. A. (2022). The frequencies of peripheral blood CD5+CD19+ B cells, CD3-CD16+CD56+ NK, and CD3+CD56+ NKT cells and serum interleukin-10 in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 18(1), 5. <https://doi.org/10.1186/S13223-021-00596-5>
- Khedr, E. M., El-Deen, H. B., El-Mokhtar, M. A., & Mahmoud, D. M. (2025). Decoding disease burden in multiple sclerosis: The role of IL-10 as biomarker of neuroinflammation and neurodegeneration. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 100. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2025.106540>
- khodadadi, S., Nikkhah Bahrami, S., Jahani, S., Rezaeimanesh, N., Ebadi, Z., Haji Naghi Tehrani, K., Naser Moghadasi, A., & Sahraian, M. A. (2025). Parental smoking before childbirth and multiple sclerosis onset in their child: a case-control study. *Acta Neurologica Belgica*, 5(125), 1261–1266. <https://doi.org/10.1007/S13760-025-02777-0>
- Kim, J.-S. (2023). Protein biomarkers in multiple sclerosis. *Encephalitis*, 3(2), 54. <https://doi.org/10.47936/ENCEPHALITIS.2022.00101>
- Klotz, L., Saraste, M., Airas, L., & Kuhlmann, T. (2025). Multiple sclerosis: 2024 update. *Free Neuropathology*, 6, 2025–6762. <https://doi.org/10.17879/FRENEUROPATHOLOGY-2025-6762>
- Krumbholz, M., Theil, D., Cepok, S., Hemmer, B., Kivisäkk, P., Ransohoff, R. M., Hofbauer, M., Farina, C., Derfuss, T., Hartle, C., Newcombe, J., Hohlfeld, R., & Meinl, E. (2006). Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain : A Journal of Neurology*, 129(Pt 1), 200–211. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWH680>
- Kucuksezer, U. C., Aktas Cetin, E., Esen, F., Tahrali, I., Akdeniz, N., Gelmez, M. Y., & Deniz, G. (2021). The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12, 622306. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.622306>

- Kuhle, J., Plavina, T., Barro, C., Disanto, G., Sangurdekar, D., Singh, C. M., de Moor, C., Engle, B., Kieseier, B. C., Fisher, E., Kappos, L., Rudick, R. A., & Goyal, J. (2020). Neurofilament light levels are associated with long-term outcomes in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(13), 1691–1699. https://doi.org/10.1177_1352458519885613
- Kuhlmann, T., Moccia, M., Coetzee, T., Cohen, J. A., Correale, J., Graves, J., Marrie, R. A., Montalban, X., Yong, V. W., Thompson, A. J., Reich, D. S., Amato, M. P., Banwell, B., Barkhof, F., Chataway, J., Chitnis, T., Comi, G., Derfuss, T., Finlayson, M., ... Waubant, E. (2023). Multiple sclerosis progression: time for a new mechanism-driven framework. *The Lancet Neurology*, 22(1), 78–88. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00289-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00289-7)
- Kurtzke, J. F. (1980). Epidemiologic contributions to multiple sclerosis. *Neurology*, 30(7 Part 2), 61 LP – 79. https://doi.org/10.1212/WNL.30.7_Part_2.61
- Lalam, N. (2006). Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. *Journal of Theoretical Biology*, 242(4), 947–953. <https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2006.06.001>
- Langer-Gould, A. M., Grisell Gonzales, E., Smith, J. B., Li, B. H., & Nelson, L. M. (2022). *Racial and Ethnic Disparities in Multiple Sclerosis Prevalence*. 18(98), e1818–e1827. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000200151>
- Lanz, T. V., Brewer, R. C., Ho, P. P., Moon, J. S., Jude, K. M., Fernandez, D., Fernandes, R. A., Gomez, A. M., Nadj, G. S., Bartley, C. M., Schubert, R. D., Hawes, I. A., Vazquez, S. E., Iyer, M., Zuchero, J. B., Teegen, B., Dunn, J. E., Lock, C. B., Kipp, L. B., ... Robinson, W. H. (2022). Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature*, 603(7900), 321–327. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04432-7>
- Lassmann, H. (2019). Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 428340. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.03116/BIBTEX>
- Lee, H. G., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2022). Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 2022 21:5, 21(5), 339–358. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00390-x>
- Lee, S. J., Seo, B. R., Choi, E. J., & Koh, J. Y. (2014). The role of reciprocal activation of cAbl and Mst1 in the oxidative death of cultured astrocytes. *Glia*, 62(4), 639–648. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22631>
- Lefvert, A. K., & Link, H. (1985). IgG production within the central nervous system: a critical review of proposed formulae. *Annals of Neurology*, 17(1), 13–20. <https://doi.org/10.1002/ANA.410170105>
- LeVine, S. M. (2016). Albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurology*, 16(1), 47. <https://doi.org/10.1186/S12883-016-0564-9>
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323/TABLES/6>
- Li, L., Huang, Z., Du, K., Liu, X., Li, C., Wang, D., Zhang, Y., Wang, C., & Li, J. (2022). Integrative Pan-Cancer Analysis Confirmed that FCGR3A is a Candidate Biomarker Associated With

- Tumor Immunity. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 900699.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.900699>
- Liao, J., Zhang, Y., Chen, X., & Zhang, J. (2021). The Roles of Peroxiredoxin 6 in Brain Diseases. *Molecular Neurobiology*, 58(9), 4348–4364. <https://doi.org/10.1007/S12035-021-02427-5>
- Link, H., & Huang, Y. M. (2006). Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *Journal of Neuroimmunology*, 180(1–2), 17–28. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2006.07.006>
- Loonstra, F. C., de Ruiter, L. R. J., Koel-Simmelink, M. J. A., Schoonheim, M. M., Strijbis, E. M. M., Moraal, B., Barkhof, F., Uitdehaag, B. M. J., Teunissen, C., & Killestein, J. (2022). Neuroaxonal and Glial Markers in Patients of the Same Age With Multiple Sclerosis. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 10(2), e200078. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000200078>
- Lopatina, O. L., Komleva, Y. K., Malinovskaya, N. A., Panina, Y. A., Morgun, A. V., & Salmina, A. B. (2020). CD157 and Brain Immune System in (Patho)physiological Conditions: Focus on Brain Plasticity. *Frontiers in Immunology*, 11, 585294. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.585294>
- López-Gómez, C., Oliver-Martos, B., Pinto-Medel, M. J., Suardiaz, M., Reyes-Garrido, V., Urbaneja, P., Fernández, Ó., & Leyva, L. (2016). Research paper: TRAIL and TRAIL receptors splice variants during long-term interferon β treatment of patients with multiple sclerosis: evaluation as biomarkers for therapeutic response. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 87(2), 130. <https://doi.org/10.1136/JNNP-2014-309932>
- López-Gómez, J., Sacristán Enciso, B., Caro Miró, M. A., & Querol Pascual, M. R. (2023). Clinically isolated syndrome: Diagnosis and risk of developing clinically definite multiple sclerosis. *Neurología (English Edition)*, 38(9), 663–670. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2021.01.010>
- Lorena, L., Maristella, P., Federica, M., Giuseppe, F., Luigi, A., & Eleonora, C. (2023). Omics approaches to understanding the efficacy and safety of disease-modifying treatments in multiple sclerosis. *Frontiers in Genetics*, 14, 1076421. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2023.1076421>
- Lorscheider, J., Buzzard, K., Jokubaitis, V., Spelman, T., Havrdova, E., Horakova, D., Trojano, M., Izquierdo, G., Girard, M., Duquette, P., Prat, A., Lugaresi, A., Grand'maison, F., Grammond, P., Hupperts, R., Alroughani, R., Sola, P., Boz, C., Pucci, E., ... Kalincik, T. (2016). Defining secondary progressive multiple sclerosis. *Brain : A Journal of Neurology*, 139(Pt 9), 2395–2405. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWW173>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9>
- Lublin, F. D., & Reingold, S. C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46(4), 907–911. <https://doi.org/10.1212/WNL.46.4.907>

- Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sørensen, P. S., Thompson, A. J., Wolinsky, J. S., Balcer, L. J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B., Calabresi, P. A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R. J., Freedman, M. S., Goodman, A. D., Inglese, M., Kappos, L., ... Polman, C. H. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 83(3), 278–286. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000560>
- Lucchini, M., De Arcangelis, V., Piro, · Geny, Nociti, V., Bianco, A., De Fino, C., Sante, G. Di, Ria, F., Calabresi, P., & Mirabella, M. (2035). *CSF CXCL13 and Chitinase 3-like-1 Levels Predict Disease Course in Relapsing Multiple Sclerosis*. 60(1), 36–50. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03060-6>
- Lundström, W., Highfill, S., Walsh, S. T. R., Beq, S., Morse, E., Kockum, I., Alfredsson, L., Olsson, T., Hillert, J., & Mackall, C. L. (2013). Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), E1761–E1770. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222303110>
- Lunin, S. M., Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Kuzekova, A. A., Novoselova, T. V., Sharapov, M. G., Mubarakshina, E. K., Goncharov, R. G., & Khrenov, M. O. (2023). Protective effect of exogenous peroxiredoxin 6 and thymic peptide thymulin on BBB conditions in an experimental model of multiple sclerosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 746, 109729. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2023.109729>
- Ly, L., Barnett, M. H., Zheng, Y. Z., Gulati, T., Prineas, J. W., & Crossett, B. (2011). Comprehensive tissue processing strategy for quantitative proteomics of formalin-fixed multiple sclerosis lesions. *Journal of Proteome Research*, 10(10), 4855–4868. <https://doi.org/10.1021/PR200672N>
- Ma, H., Yang, J., Xu, S., Liu, C., & Zhang, Q. (2020). Combination of multiple functional markers to improve diagnostic accuracy. *Journal of Applied Statistics*, 49(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/02664763.2020.1796945>
- Maciak, K., Dziedzic, A., Miller, E., & Saluk-bijak, J. (2021). miR-155 as an Important Regulator of Multiple Sclerosis Pathogenesis. A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4332. <https://doi.org/10.3390/IJMS22094332>
- Maggi, P., Absinta, M., Grammatico, M., Vuolo, L., Emmi, G., Carlucci, G., Spagni, G., Barilaro, A., Repice, A. M., Emmi, L., Prisco, D., Martinelli, V., Scotti, R., Sadeghi, N., Perrotta, G., Sati, P., Dachy, B., Reich, D. S., Filippi, M., & Massacesi, L. (2018). Central vein sign differentiates Multiple Sclerosis from central nervous system inflammatory vasculopathies. *Annals of Neurology*, 83(2), 283–294. <https://doi.org/10.1002/ANA.25146>
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., & Aloisi, F. (2007). Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain : A Journal of Neurology*, 130(Pt 4), 1089–1104. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWM038>
- Magliozzi, R., Pitteri, M., Ziccardi, S., Pisani, A. I., Montibeller, L., Marastoni, D., Rossi, S., Mazziotti, V., Guandalini, M., Dapor, C., Schiavi, G., Tamanti, A., Nicholas, R., Reynolds, R., & Calabrese, M. (2021). CSF parvalbumin levels reflect interneuron loss linked with cortical pathology in multiple sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 8(3), 534–547. <https://doi.org/10.1002/ACN3.51298>

- Magliozzi, R., Scalfari, A., Pisani, A. I., Ziccardi, S., Marastoni, D., Pizzini, F. B., Bajrami, A., Tamanti, A., Guandalini, M., Bonomi, S., Rossi, S., Mazziotti, V., Castellaro, M., Montemezzi, S., Rasia, S., Capra, R., Pitteri, M., Romualdi, C., Reynolds, R., & Calabrese, M. (2020). The CSF Profile Linked to Cortical Damage Predicts Multiple Sclerosis Activity. *Annals of Neurology*, 88(3), 562–573. <https://doi.org/10.1002/ANA.25786>
- Magraner, M. J., Bosca, I., Simó-Castelló, M., García-Martí, G., Alberich-Bayarri, A., Coret, F., Álvarez-Cermeño, J. C., Martí-Bonmatí, L., Villar, L. M., & Casanova, B. (2012). Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes. *Neuroradiology*, 54(1), 5–12. <https://doi.org/10.1007/S00234-011-0841-7/FIGURES/4>
- Malhotra, S., Costa, C., Eixarch, H., Keller, C. W., Amman, L., Martínez-Banaclocha, H., Midaglia, L., Sarró, E., Machín-Díaz, I., Villar, L. M., Triviño, J. C., Oliver-Martos, B., Parladé, L. N., Calvo-Barreiro, L., Matesanz, F., Vandenbroeck, K., Urcelay, E., Martínez-Ginés, M. L., Tejeda-Velarde, A., ... Comabella, M. (2020). NLRP3 inflammasome as prognostic factor and therapeutic target in primary progressive multiple sclerosis patients. *Brain*, 143(5), 1414–1430. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa084>
- Mamik, M. K., & Power, C. (2017). Inflammasomes in neurological diseases: emerging pathogenic and therapeutic concepts. *Brain*, 140(9), 2273–2285. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWX133>
- Mandrioli, J., Sola, P., Bedin, R., Gambini, M., & Merelli, E. (2008). A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis: Cerebrospinal fluid IgM oligoclonal bands and clinical features to predict the evolution of the disease. *Journal of Neurology*, 255(7), 1023–1031. <https://doi.org/10.1007/S00415-008-0827-5/METRICS>
- Marangon, D., Boda, E., Parolisi, R., Negri, C., Giorgi, C., Montarolo, F., Perga, S., Bertolotto, A., Buffo, A., Abbracchio, M. P., & Lecca, D. (2020). In vivo silencing of miR-125a-3p promotes myelin repair in models of white matter demyelination. *Glia*, 68(10), 2001–2014. <https://doi.org/10.1002/GLIA.23819>
- Marrosu, M. G., Murru, M. R., Costa, G., Murru, R., Muntoni, F., & Cucca, F. (1998). DRB1-DQA1-DQB1 Loci and Multiple Sclerosis Predisposition in the Sardinian Population. *Human Molecular Genetics*, 7(8), 1235–1237. <https://doi.org/10.1093/HMG/7.8.1235>
- Martínez, M. A. M., Olsson, B., Bau, L., Matas, E., Calvo, Á. C., Andreasson, U., Blennow, K., Romero-Pinel, L., Martínez-Yélamos, S., & Zetterberg, H. (2015). Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid predict progression in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 21(5), 550–561. https://doi.org/10.1177_1352458514549397
- Matute-Blanch, C., Villar, L. M., Álvarez-Cermeño, J. C., Rejdak, K., Evdoshenko, E., Makshakov, G., Nazarov, V., Lapin, S., Midaglia, L., Vidal-Jordana, A., Drulovic, J., García-Merino, A., Sánchez-López, A. J., Havrdova, E., Saiz, A., Llufríu, S., Alvarez-Lafuente, R., Schroeder, I., Zettl, U. K., ... Comabella, M. (2018). Neurofilament light chain and oligoclonal bands are prognostic biomarkers in radiologically isolated syndrome. *Brain*, 141(4), 1085–1093. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWY021>
- Mazziotti, V., Crescenzo, F., Turano, E., Guandalini, M., Bertolazzo, M., Ziccardi, S., Virla, F., Camera, V., Marastoni, D., Tamanti, A., & Calabrese, M. (2024). The contribution of tumor necrosis factor to multiple sclerosis: a possible role in progression independent of

- relapse? *Journal of Neuroinflammation*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12974-024-03193-6>
- McLaughlin, K. A., Chitnis, T., Newcombe, J., Franz, B., Kennedy, J., McArdel, S., Kuhle, J., Kappos, L., Rostasy, K., Pohl, D., Gagne, D., Ness, J. M., Tenenbaum, S., O'Connor, K. C., Viglietta, V., Wong, S. J., Tavakoli, N. P., de Seze, J., Idrissova, Z., ... Wucherpfennig, K. W. (2009). Age-dependent B cell autoimmunity to a myelin surface antigen in pediatric multiple sclerosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(6), 4067–4076. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0801888>
- Meier, S., Willemse, E. A. J., Schaedel, S., Oechtering, J., Lorscheider, J., Melie-Garcia, L., Cagol, A., Barakovic, M., Galbusera, R., Subramaniam, S., Barro, C., Abdelhak, A., Thebault, S., Achtnichts, L., Lalive, P., Müller, S., Pot, C., Salmen, A., Disanto, G., ... Kuhle, J. (2023). Serum Glial Fibrillary Acidic Protein Compared With Neurofilament Light Chain as a Biomarker for Disease Progression in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurology*, 80(3), 287–297. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2022.5250>
- Miller, D. H., & Leary, S. M. (2007). Primary-progressive multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology*, 6(10), 903–912. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70243-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70243-0)
- Mitsdoerffer, M., Kuchroo, V., & Korn, T. (2013). Immunology of neuromyelitis optica: A T cell–B cell collaboration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1283(1), 57. <https://doi.org/10.1111/NYAS.12118>
- Moccia, M., Van De Pavert, S., Eshaghi, A., Haider, L., Pichat, J., Yiannakas, M., Ourselin, S., Wang, Y., Wheeler-Kingshott, C., Thompson, A., Barkhof, F., & Ciccarelli, O. (2020). Pathologic correlates of the magnetization transfer ratio in multiple sclerosis. *Neurology*, 95(22), E2965–E2976. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010909>
- Mohseni, M., Behzad, G., Farhadi, A., Behroozi, J., Mohseni, H., & Valipour, B. (2025). MicroRNA frontiers: Illuminating early detection paths in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 95, 106237. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2024.106237>
- Molitor, L., Bacher, S., Burczyk, S., & Niessing, D. (2021). The Molecular Function of PURA and Its Implications in Neurological Diseases. *Frontiers in Genetics*, 12, 638217. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.638217>
- Montazmanesh, S., Shobeiri, P., Saghaizadeh, A., Teunissen, C. E., Burman, J., Szalardy, L., Klivenyi, P., Bartos, A., Fernandes, A., & Rezaei, N. (2021). Neuronal and glial CSF biomarkers in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Reviews in the Neurosciences*, 32(6), 573–595. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0145>
- Montalban, X., Hauser, S. L., Kappos, L., Arnold, D. L., Bar-Or, A., Comi, G., de Seze, J., Giovannoni, G., Hartung, H. P., Hemmer, B., Lublin, F., Rammohan, K. W., Selmaj, K., Traboulsee, A., Sauter, A., Masterman, D., Fontoura, P., S, B., Garren, H., ... Wolinsky, J. S. (2017). Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 376(3), 30–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1606468>
- Montalban, X., Lebrun-Frénay, C., Oh, J., Arrambide, G., Moccia, M., Pia Amato, M., Amezcua, L., Banwell, B., Bar-Or, A., Barkhof, F., Butzkueven, H., Ciccarelli, O., Chataway, J., Cohen, J. A., Comi, G., Correale, J., Deisenhammer, F., Filippi, M., Fiol, J., ... Thompson, A. J.

- (2025). Diagnosis of multiple sclerosis: 2024 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*, 24(10), 850–865. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(25\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(25)00270-4)
- Munger, K. L., Zhang, S. M., O'Reilly, E., Hernán, M. A., Olek, M. J., Willett, W. C., & Ascherio, A. (2004). Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*, 62(1), 60–65. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000101723.79681.38>
- Muñoz-San Martín, M., Reverter, G., Robles-Cedeño, R., Buxó, M., José Ortega, F., Gómez, I., Tomàs-Roig, J., Celarain, N., María Villar, L., Perkal, H., Manuel Fernández-Real, J., Quintana, E., & Ramió-Torrentà, L. (2019). *Analysis of miRNA signatures in CSF identifies upregulation of miR-21 and miR-146a/b in patients with multiple sclerosis and active lesions*. 1(16), 220. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1590-5>
- Muñoz-San Martín, M., Torras, S., Robles-Cedeño, R., Buxó, M., Gomez, I., Matute-Blanch, C., Comabella, M., Villar, L. M., Perkal, H., Quintana, E., & Ramió-Torrentà, L. (2020). Radiologically isolated syndrome: targeting miRNAs as prognostic biomarkers. *Epigenomics*, 12(23), 2065–2076. <https://doi.org/10.2217/EPI-2020-0172>
- Nakahara, J., & Aiso, S. (2006). Fc receptor-positive cells in remyelinating multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(6), 582–591. <https://doi.org/10.1097/00005072-200606000-00006>
- Nemeth, D. P., Liu, X., Monet, M. C., Niu, H., Maxey, G., Schrier, M. S., Smirnova, M. I., McGovern, S. J., Herd, A., DiSabato, D. J., Floyd, T., Atluri, R. R., Nusstein, A. C., Oliver, B., Witcher, K. G., Juste Ellis, J. S., Yip, J., Crider, A. D., McKim, D. B., ... Quan, N. (2024). Localization of brain neuronal IL-1R1 reveals specific neural circuitries responsive to immune signaling. *Journal of Neuroinflammation*, 21(1), 303. <https://doi.org/10.1186/S12974-024-03287-1>
- Nguyen, K. T., & Pei, D. (2005). Purification and characterization of enzymes involved in the degradation of chemotactic N-formyl peptides. *Biochemistry*, 44(23), 8514–8522. <https://doi.org/10.1021/BI050191O>
- Niiranen, M., Kontkanen, A., Jääskeläinen, O., Tertsunen, H. M., Selander, T., Hartikainen, P., Huber, N., Solje, E., Haapasalo, A., Kokkola, T., Lohioja, T., Herukka, S. K., Simula, S., & Remes, A. M. (2021). Serum GFAP and NFL levels in benign relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 56, 103280. <https://doi.org/10.1016/J.MSARD.2021.103280>
- Nikom, D., & Zheng, S. (2023). Alternative splicing in neurodegenerative disease and the promise of RNA therapies. *Nature Reviews Neuroscience* 2023 24:8, 24(8), 457–473. <https://doi.org/10.1038/s41583-023-00717-6>
- Novakova, L., Zetterberg, H., Sundström, P., Axelsson, M., Khademi, M., Gunnarsson, M., Malmeström, C., Svenningsson, A., Olsson, T., Piehl, F., Blennow, K., & Lycke, J. (2017). Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology*, 89(22), 2230–2237. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004683>
- Oechtering, J., Stein, K., Schaedelin, S. A., Maceski, A. M., Orleth, A., Meier, S., Willemse, E., Qureshi, F., Heijnen, I., Regeniter, A., Derfuss, T., Benkert, P., D'Souza, M., Limberg, M., Fischer-Barnicol, B., Achtnichts, L., Mueller, S., Salmen, A., Lalive, P. H., ... Kuhle, J. (2024). Complement Activation Is Associated With Disease Severity in Multiple Sclerosis.

- Neurology: Neuroimmunology and NeuroInflammation*, 11(2), e200212.
<https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000200212>
- Oh, J., Vidal-Jordana, A., & Montalban, X. (2018). Multiple sclerosis: Clinical aspects. *Current Opinion in Neurology*, 31(6), 752–759. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000622>
- Olsson, A., Gustavsen, S., Hasselbalch, I. C., Langkilde, A. R., Sellebjerg, F., Oturai, A. B., & Søndergaard, H. B. (2020). Biomarkers of inflammation and epithelial barrier function in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 46, 102520.
<https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102520>
-  rpez-Zafra, T., Pav a, J., Hurtado-Guerrero, I., Pinto-Medel, M. J., Rodríguez Bada, J. L., Urbaneja, P., Suard az, M., Villar, L. M., Comabella, M., Montalban, X., Alvarez-Cermeño, J. C., Leyva, L., Fernández,  ., & Oliver-Martos, B. (2017). Decreased soluble IFN-  receptor (sIFNAR2) in multiple sclerosis patients: A potential serum diagnostic biomarker. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 23(7), 937–945.
<https://doi.org/10.1177/1352458516667564>
-  rpez-Zafra, T., Pavi a, J., Pinto-Medel, M. J., Hurtado-Guerrero, I., Rodríguez-Bada, J. L., Martín Montañez, E., Fernández,  ., Leyva, L., & Oliver-Martos, B. (2015). Development and validation of an ELISA for quantification of soluble IFN-  receptor: assessment in multiple sclerosis. *Bioanalysis*, 7(22), 2869–2880. <https://doi.org/10.4155/BIO.15.208>
- Ortolan, E., Augeri, S., Fissolo, G., Musso, I., & Funaro, A. (2019). CD157: From immunoregulatory protein to potential therapeutic target. *Immunology Letters*, 205, 59–64. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2018.06.007>
- Oturai, D. B., Søndergaard, H. B., B rnsen, L., Sellebjerg, F., & Romme Christensen, J. (2016). Identification of Suitable Reference Genes for Peripheral Blood Mononuclear Cell Subset Studies in Multiple Sclerosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 83(1), 72–80.
<https://doi.org/10.1111/SJI.12391>
- Paraboschi, E. M., Cardamone, G., Rimoldi, V., Gemmati, D., Spreafico, M., Duga, S., Sold , G., & Asselta, R. (2015). Meta-analysis of multiple sclerosis microarray data reveals dysregulation in RNA splicing regulatory genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23463–23481. <https://doi.org/10.3390/ijms161023463>
- Parfenyuk, S. B., Glushkova, O. V., Sharapov, M. G., Khrenov, M. O., Lunin, S. M., Kuzekova, A. A., Mubarakshina, E. K., Novoselova, T. V., Cherenkov, D. A., & Novoselova, E. G. (2023). Protective Effects of Peroxiredoxin 6 in Pro-Inflammatory Response Model Using Raw 264.7 Macrophages. *Biochemistry. Biokhimiia*, 88(8), 1156–1164.
<https://doi.org/10.1134/S0006297923080096>
- Patsopoulos, N. A., Baranzini, S. E., Santaniello, A., Shoostari, P., Cotsapas, C., Wong, G., Beecham, A. H., James, T., Replogle, J., Vlachos, I. S., McCabe, C., Pers, T. H., Brandes, A., White, C., Keenan, B., Cimpean, M., Winn, P., Panteliadis, I. P., Robbins, A., ... De Jager, P. L. (2019). Multiple Sclerosis Genomic Map implicates peripheral immune cells & microglia in susceptibility. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6460), eaav7188.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAV7188>

- Paul, A., Comabella, M., & Gandhi, R. (2019). Biomarkers in multiple sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(3), a029058. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A029058>
- Perkins, N. J., & Schisterman, E. F. (2006). The inconsistency of “optimal” cutpoints obtained using two criteria based on the receiver operating characteristic curve. *American Journal of Epidemiology*, 163(7), 670–675. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWJ063>
- Peschl, P., Bradl, M., Höftberger, R., Berger, T., & Reindl, M. (2017). Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: Deciphering a Target in Inflammatory Demyelinating Diseases. *Frontiers in Immunology*, 8, 529. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00529>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6), 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- Pfuhl, C., Grittner, U., Gieß, R. M., Scheel, M., Behrens, J. R., Rasche, L., Pache, F. C., Wenzel, R., Brandt, A. U., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Ruprecht, K., & Oechtering, J. (2019). Intrathecal IgM production is a strong risk factor for early conversion to multiple sclerosis. *Neurology*, 93(15), e1439–e1451. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008237>
- Pietroboni, A. M., Caprioli, M., Carandini, T., Scarioni, M., Ghezzi, L., Arighi, A., Cioffi, S., Cinnante, C., Fenoglio, C., Oldoni, E., De Riz, M. A., Basilico, P., Fumagalli, G. G., Colombi, A., Giulietti, G., Serra, L., Triulzi, F., Bozzali, M., Scarpini, E., & Galimberti, D. (2018). CSF β -amyloid predicts prognosis in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 25(9), 1223–1231. <https://doi.org/10.1177/1352458518791709>
- Plantone, D., Marti, A., Frisullo, G., Iorio, R., Damato, V., Nociti, V., Patanella, A. K., Bianco, A., Mirabella, M., & Batocchi, A. P. (2013). Circulating CD56dim NK cells expressing perforin are increased in progressive multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 265(1–2), 124–127. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2013.10.004>
- Plog, B. A., Dashnaw, M. L., Hitomi, E., Peng, W., Liao, Y., Lou, N., Deane, R., & Nedergaard, M. (2015). Biomarkers of traumatic injury are transported from brain to blood via the lymphatic system. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(2), 518–526. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3742-14.2015>
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B., & Wolinsky, J. S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*, 69(2), 292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Pomary, P. K., Eichau, S., Amigó, N. N., Barrios, L., Matesanz, F., García-Valdecasas, M., Hrom, I., García Sánchez, M. I., & Garcia-Martin, M. L. (2023). *MMultifaceted Analysis of Cerebrospinal Fluid and Serum from Progressive Multiple Sclerosis Patients: Potential Role*

- of Vitamin C and Metal Ion Imbalance in the Divergence of Primary Progressive Multiple Sclerosis and Secondary Progressive Multiple Sclerosis*. 3(22), 743–757.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00460>
- Ponath, G., Park, C., & Pitt, D. (2018). The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 9, 217. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00217>
- Poser, C. M., Paty, D. W., Scheinberg, L., McDonald, W. I., Davis, F. A., Ebers, G. C., Johnson, K. P., Sibley, W. A., Silberberg, D. H., & Tourtellotte, W. W. (1983). New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of Neurology*, 13(3), 227–231. <https://doi.org/10.1002/ANA.410130302>
- Presumey, J., Bialas, A. R., & Carroll, M. C. (2017). Complement System in Neural Synapse Elimination in Development and Disease. *Advances in Immunology*, 135, 53–79.
<https://doi.org/10.1016/BS.AI.2017.06.004>
- Preziosa, P., Rocca, M. A., & Filippi, M. (2020). Current state-of-art of the application of serum neurofilaments in multiple sclerosis diagnosis and monitoring. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 20(8), 747–769. <https://doi.org/10.1080/14737175.2020.1760846>
- Prinz, M., Masuda, T., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2021). Microglia and Central Nervous System—Associated Macrophages—From Origin to Disease Modulation. *Annual Review of Immunology*, 39, 251–277. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-093019-110159>
- Pryce, G., & Baker, D. (2018). Oligoclonal bands in multiple sclerosis; Functional significance and therapeutic implications. Does the specificity matter? *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 25, 131–137. <https://doi.org/10.1016/J.MSARD.2018.07.030>
- Ramos, T. N., Bullard, D. C., & Barnum, S. R. (2014). ICAM-1: isoforms and phenotypes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(10), 4469–4474.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1400135>
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245(2), 154–160. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1996.9916>
- Risco, J., Maldonado, H., Luna, L., Osada, J., Ruiz, P., Juárez, A., & Vizcarra, D. (2011). Latitudinal prevalence gradient of multiple sclerosis in Latin America. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 17(9), 1055–1059.
<https://doi.org/10.1177/1352458511405562>
- Rispoli, M. G., Valentinuzzi, S., De Luca, G., Del Boccio, P., Federici, L., Di Iorio, M., Digiovanni, A., Grasso, E. A., Pozzilli, V., Villani, A., Chiarelli, A. M., Onofri, M., Wise, R. G., Pieragostino, D., & Tomassini, V. (2021). Contribution of Metabolomics to Multiple Sclerosis Diagnosis, Prognosis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20). <https://doi.org/10.3390/IJMS222011112>
- Rival, M., Galoppin, M., & Thouvenot, E. (2022). Biological Markers in Early Multiple Sclerosis: the Paved Way for Radiologically Isolated Syndrome. *Frontiers in Immunology*, 13, 866092. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.866092>

- Robinson, W. H., & Steinman, L. (2022). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Science*, 375(6578), 264–265. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABM7930>
- Rodríguez-Jorge, F., Fernández-Velasco, J. I., Villarrubia, N., Gracia-Gil, J., Fernández, E., Meca-Lallana, V., Díaz-Pérez, C., Sainz de la Maza, S., Pacheco, E. M., Quiroga, A., Ramió-Torrentà, L., Martínez-Yélamos, S., Bau, L., Monreal, E., López-Real, A., Rodero-Romero, A., Borrega, L., Díaz, S., Eguía, P., ... Villar, L. M. (2024). Biomarkers of response to ocrelizumab in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 15, 1480676. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2024.1480676>
- Rossi, S., Motta, C., Studer, V., Barbieri, F., Buttari, F., Bergami, A., Sancesario, G., Bernardini, S., De Angelis, G., Martino, G., Furlan, R., & Centonze, D. (2014). Tumor necrosis factor is elevated in progressive multiple sclerosis and causes excitotoxic neurodegeneration. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 20(3), 304–312. <https://doi.org/10.1177/1352458513498128>
- Rothhammer, V., Borucki, D. M., Tjon, E. C., Takenaka, M. C., Chao, C. C., Ardura-Fabregat, A., De Lima, K. A., Gutiérrez-Vázquez, C., Hewson, P., Staszewski, O., Blain, M., Healy, L., Neziraj, T., Borio, M., Wheeler, M., Dragin, L. L., Laplaud, D. A., Antel, J., Alvarez, J. I., ... Quintana, F. J. (2018). Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*, 557(7707), 724–728. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0119-x>
- Rovira, À., Auger, C., & Alonso, J. (2013). Magnetic resonance monitoring of lesion evolution in multiple sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6(5), 298–310. <https://doi.org/10.1177/1756285613484079>
- Ruopp, M. D., Perkins, N. J., Whitcomb, B. W., & Schisterman, E. F. (2008). Youden Index and optimal cut-point estimated from observations affected by a lower limit of detection. *Biometrical Journal. Biometrische Zeitschrift*, 50(3), 419–430. <https://doi.org/10.1002/BIMJ.200710415>
- Russi, A. E., Ebel, M. E., Yang, Y., & Brown, M. A. (2018). Male-specific IL-33 expression regulates sex-dimorphic EAE susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(7), E1520–E1529. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710401115>
- Sadeghian-Rizi, T., Khanahmad, H., & Jahanian-Najafabadi, A. (2018). Therapeutic Targeting of Chemokines and Chemokine Receptors in Multiple Sclerosis: Opportunities and Challenges. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 17(7), 496–508. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180713111100>,
- Sáenz-Cuesta, M., Osorio-Querejeta, I., & Otaegui, D. (2014). Extracellular Vesicles in Multiple Sclerosis: What are They Telling Us? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 100. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00100>
- Sak, M., Chariker, J. H., Park, J. W., & Rouchka, E. C. (2024). Gene Expression and Alternative Splicing Analysis in a Large-Scale Multiple Sclerosis Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 11957. <https://doi.org/10.3390/IJMS252211957>
- Saraste, M., Bezukladova, S., Matilainen, M., Sucksdorff, M., Kuhle, J., Leppert, D., & Airas, L. (2021). Increased serum glial fibrillary acidic protein associates with microstructural

- white matter damage in multiple sclerosis: GFAP and DTI. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 50, 102810. <https://doi.org/10.1016/J.MSARD.2021.102810>
- Saruhan-Direskeneli, G., Esin, S., Baykan-Kurt, B., Örneke, I., Vaughan, R., & Eraksoy, M. (1997). HLA-DR and -DQ Associations with Multiple Sclerosis in Turkey. *Human Immunology*, 55(1), 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(97\)00086-4](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(97)00086-4)
- Segal, B. M. (2019). Multiple Sclerosis. In *Clinical Immunology: Principles and Practice* (Fifth Edit). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00066-1>
- Sen, M. K., Almuslehi, M. S. M., Shortland, P. J., Mahns, D. A., & Coorsen, J. R. (2021). Proteomics of multiple sclerosis: Inherent issues in defining the pathoetiology and identifying (early) biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14). <https://doi.org/10.3390/IJMS22147377>
- Shao, S., Chen, C., Shi, G., Zhou, Y., Wei, Y., Fan, N., Yang, Y., Wu, L., & Zhang, T. (2021). Therapeutic potential of the target on NLRP3 inflammasome in multiple sclerosis. *Pharmacology and Therapeutics*, 227, 107880. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107880>
- Shaw, P. J., McDermott, M. F., & Kanneganti, T. D. (2011). Inflammasomes and autoimmunity. *Trends in Molecular Medicine*, 17(2), 57–64. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2010.11.001>
- Shi, Z., & Zhou, Z. (2017). MST kinases in innate immune signaling. *Cell Stress*, 2(1), 4–13. <https://doi.org/10.15698/CST2018.01.119>
- Signoriello, E., Lus, G., Polito, R., Casertano, S., Scudiero, O., Coletta, M., Monaco, M. L., Rossi, F., Nigro, E., & Daniele, A. (2018). Adiponectin profile at baseline is correlated to progression and severity of multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 26(2), 348–355. <https://doi.org/10.1111/ENE.13822>
- Simpson, S., Wang, W., Otahal, P., Blizzard, L., Van Der Mei, I. A. F., & Taylor, B. V. (2019). Latitude continues to be significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: An updated meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 90(11), 1193–1200. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-320189>
- Skerka, C., Chen, Q., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2013). Complement factor H related proteins (CFHRs). *Molecular Immunology*, 56(3), 170–180. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2013.06.001>
- Soldan, S. S., & Lieberman, P. M. (2022). Epstein–Barr virus and multiple sclerosis. *Nature Reviews Microbiology* 2022 21:1, 21(1), 51–64. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00770-5>
- Solomon, A. J., & Corboy, J. R. (2017). The tension between early diagnosis and misdiagnosis of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology* 2017 13:9, 13(9), 567–572. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2017.106>
- Solomon, A. J., Weinstein, S. M., Shinohara, R. T., Aoun, S. M., Schmidt, H., & Solari, A. (2025). Diagnostic delay and misdiagnosis of symptoms reported by patients with multiple sclerosis participating in a research registry. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental*,

- Translational and Clinical*, 11(2), 20552173251333390.
<https://doi.org/10.1177/20552173251333390>
- Sotirchos, E. S., Fitzgerald, K. C., Singh, C. M., Smith, M. D., Reyes-Mantilla, M., Hersh, C. M., Hyland, M. H., Canissario, R., Simmons, S. B., Arrambide, G., Montalban, X., Comabella, M., Naismith, R. T., Qiao, M., Krupp, L. B., Nicholas, J. A., Akgün, K., Ziemssen, T., Rudick, R., ... Calabresi, P. A. (2023). Associations of sNfL with clinico-radiological measures in a large MS population. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 10(1), 84–97.
<https://doi.org/10.1002/ACN3.51704>
- Spurlock, C. F., Tossberg, J. T., Guo, Y., Sriram, S., Crooke, P. S., & Aune, T. M. (2015). Defective structural RNA processing in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Genome Biology*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13059-015-0629-X>
- Srpova, B., Uher, T., Hrciarova, T., Barro, C., Anelova, M., Michalak, Z., Vaneckova, M., Krasensky, J., Noskova, L., Havrdova, E. K., Kuhle, J., & Horakova, D. (2021). Serum neurofilament light chain reflects inflammation-driven neurodegeneration and predicts delayed brain volume loss in early stage of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 27(1), 52–60. <https://doi.org/10.1177/1352458519901272>
- Stampanoni Bassi, M., Iezzi, E., Drulovic, J., Pekmezovic, T., Gilio, L., Furlan, R., Finardi, A., Marfia, G. A., Sica, F., Centonze, D., & Buttari, F. (2020). IL-6 in the Cerebrospinal Fluid Signals Disease Activity in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 535794. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.00120/BIBTEX>
- Sun, M. J., Liu, N., Xie, Q. F., Li, X., Sun, J., Wang, H., & Wang, M. X. (2021). A candidate biomarker of glial fibrillary acidic protein in CSF and blood in differentiating multiple sclerosis and its subtypes: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 51, 102870. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.102870>
- Suzuki, M., Tezuka, K., Handa, T., Sato, R., Takeuchi, H., Takao, M., Tano, M., & Uchida, Y. (2022). Upregulation of ribosome complexes at the blood-brain barrier in Alzheimer's disease patients. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 42(11), 2134–2150. <https://doi.org/10.1177/0271678X221111602>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D605–D612. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1074>
- Talaat, F., Abdelatty, S., Ragaie, C., & Dahshan, A. (2023). Chitinase-3-like 1-protein in CSF: a novel biomarker for progression in patients with multiple sclerosis. *Neurological Sciences : Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 44(9), 3243–3252. <https://doi.org/10.1007/S10072-023-06764-2>
- Tamam, Y., Gunes, B., Akbayir, E., Kizilay, T., Karaaslan, Z., Koral, G., Duzel, B., Kucukali, C. I., Gunduz, T., Kurtuncu, M., Yilmaz, V., Tuzun, E., & Turkoglu, R. (2021). CSF levels of HoxB3 and YKL-40 may predict conversion from clinically isolated syndrome to relapsing remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 48, 102697. <https://doi.org/10.1016/J.MSARD.2020.102697>

- Tatomir, A., Talpos-Caia, A., Anselmo, F., Kruszewski, A. M., Boodhoo, D., Rus, V., & Rus, H. (2017). The complement system as a biomarker of disease activity and response to treatment in multiple sclerosis. *Immunologic Research*, 65(6), 1103–1109. <https://doi.org/10.1007/S12026-017-8961-8>
- Thangarajh, M., Gomez-Rial, J., Hedström, A. K., Hillert, J., Alvarez-Cermeño, J. C., Masterman, T., & Villar, L. M. (2008). Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 14(9), 1208–1213. <https://doi.org/10.1177/1352458508095729>
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., ... Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet. Neurology*, 17(2), 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Tian, Y., Apperson, M. L., Ander, B. P., Liu, D., Stomova, B. S., Jickling, G. C., Enriquez, R., Agius, M. A., & Sharp, F. R. (2011). Differences in exon expression and alternatively spliced genes in blood of multiple sclerosis compared to healthy control subjects. *Journal of Neuroimmunology*, 230(1–2), 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.09.001>
- Torres Iglesias, G., Fernández-Fournier, M., Botella, L., Piniella, D., Laso-García, F., Carmen Gómez-de Frutos, M., Chamorro, B., Puertas, I., Tallón Barranco, A., Fuentes, B., Alonso de Leciñana, M., Alonso-López, E., Bravo, S. B., Eugenia Miranda-Carús, M., Montero-Calle, A., Barderas, R., Díez-Tejedor, E., Gutiérrez-Fernández, M., & Otero-Ortega, L. (2023). Brain and immune system-derived extracellular vesicles mediate regulation of complement system, extracellular matrix remodeling, brain repair and antigen tolerance in Multiple sclerosis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 113, 44–55. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2023.06.025>
- Tremlett, H., Dai, D. L. Y., Hollander, Z., Kapanen, A., Aziz, T., Wilson-McManus, J. E., Tebbutt, S. J., Borchers, C. H., Oger, J., & Cohen Freue, G. V. (2015). Serum proteomics in multiple sclerosis disease progression. *Journal of Proteomics*, 118, 2–11. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2015.02.018>
- Tyler, K., Geilman, S., Bell, D. M., Taylor, N., Honeycutt, S. C., Garrett, P. I., Hillhouse, T. M., & Covey, T. M. (2021). Acyl Peptide Enzyme Hydrolase (APEH) activity is inhibited by lipid metabolites and peroxidation products. *Chemico-Biological Interactions*, 348, 109639. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2021.109639>
- Uher, T., Adzima, A., Srpova, B., Noskova, L., Maréchal, B., Maceski, A. M., Krasensky, J., Stastna, D., Andelova, M., Novotna, K., Vodehnalova, K., Motyl, J., Friedova, L., Lindner, J., Ravano, V., Burgetova, A., Dusek, P., Fialova, L., Havrdova, E. K., ... Vaneckova, M. (2023). Diagnostic delay of multiple sclerosis: prevalence, determinants and consequences. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 29(11–12), 1437–1451. <https://doi.org/10.1177/13524585231197076>
- Urbaneja, P., Hurtado-Guerrero, I., Hernández, M. Á., Oliver-Martos, B., Oreja-Guevara, C., Ortega-Pinazo, J., Alonso, A., Barón-López, F. J., Leyva, L., Fernández, Ó., & Pinto-Medel, M. J. (2020). Skin phototype could be a risk factor for multiple sclerosis. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/JCM9082384>

- Uzawa, A., Mori, M., Masuda, H., Ohtani, R., Uchida, T., Aoki, R., & Kuwabara, S. (2020). Peroxiredoxins are involved in the pathogenesis of multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Clinical and Experimental Immunology*, 202(2), 239–248. <https://doi.org/10.1111/CEI.13487>
- van Langelaar, J., Rijvers, L., Smolders, J., & van Luijn, M. M. (2020). B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Frontiers in Immunology*, 11, 497059. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00760>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034.1. <https://doi.org/10.1186/GB-2002-3-7-RESEARCH0034>
- Vermunt, L., Otte, M., Verberk, I. M. W., Killestein, J., Lemstra, A. W., van der Flier, W. M., Pijnenburg, Y. A. L., Vijverberg, E. G. B., Bouwman, F. H., Gravesteijn, G., van de Berg, W. D. J., Scheltens, P., van Harten, A. C., Willemse, E. A. J., & Teunissen, C. E. (2022). Age- and disease-specific reference values for neurofilament light presented in an online interactive support interface. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 9(11), 1832–1837. <https://doi.org/10.1002/ACN3.51676>
- Vidal-Jordana, A., & Montalban, X. (2017). Multiple Sclerosis: Epidemiologic, Clinical, and Therapeutic Aspects. In *Neuroimaging Clinics of North America* (Vol. 27, Issue 2, pp. 195–204). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2016.12.001>
- Villar, L. M., Casanova, B., Ouamara, N., Comabella, M., Jalili, F., Leppert, D., De Andrés, C., Izquierdo, G., Arroyo, R., Avşar, T., Lapin, S. V., Johnson, T., Montalbán, X., Fernández, O., Álvarez-Lafuente, R., Masterman, D., García-Sánchez, M. I., Coret, F., Siva, A., ... Bar-Or, A. (2014). Immunoglobulin M oligoclonal bands: Biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 76(2), 231–240. <https://doi.org/10.1002/ANA.24190>
- Villar, L. M., García-Barragán, N., Espiño, M., Roldán, E., Sádaba, M., Gómez-Rial, J., González-Qué, P., & Álvarez-Cermeño, J. C. (2007). Influence of oligoclonal IgM specificity in multiple sclerosis disease course. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 14(2), 183–187. <https://doi.org/10.1177/1352458507082046>
- Villar, L. M., Masjuan, J., González-Qué, P., Plaza, J., Sádaba, M. C., Roldán, E., Bootello, A., & Álvarez-Cermeño, J. C. (2003). Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 53(2), 222–226. <https://doi.org/10.1002/ANA.10441>
- Villar, L. M., Masterman, T., Casanova, B., Gómez-Rial, J., Espiño, M., Sádaba, M. C., González-Qué, P., Coret, F., & Álvarez-Cermeño, J. C. (2009). CSF oligoclonal band patterns reveal disease heterogeneity in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 211(1–2), 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.03.003>
- Villar, L. M., Sádaba, M. C., Roldán, E., Masjuan, J., González-Qué, P., Villarrubia, N., Espiño, M., García-Trujillo, J. A., Bootello, A., & Álvarez-Cermeño, J. C. (2005). Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(1), 187–194. <https://doi.org/10.1172/JCI22833>

- Voskuhl, R. R., Sawalha, A. H., & Itoh, Y. (2018). Sex chromosome contributions to sex differences in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Multiple Sclerosis*, 24(1), 22–31. <https://doi.org/10.1177/1352458517737394>
- Wagner, C. A., Roqué, P. J., & Goverman, J. M. (2020). Pathogenic T cell cytokines in multiple sclerosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(1), e20190460–e20190460. <https://doi.org/10.1084/JEM.20190460>
- Wagner, C. A., Roqué, P. J., Mileur, T. R., Liggitt, D., & Goverman, J. M. (2020). Myelin-specific CD8+ T cells exacerbate brain inflammation in CNS autoimmunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(1), 203–213. <https://doi.org/10.1172/JCI132531>
- Wahbeh, F., & Sabatino, J. J. (2025). Epstein-Barr Virus in Multiple Sclerosis: Past, Present, and Future. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 12(6), e200460. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000200460>
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., & Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 26(14), 1816–1821. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>
- Watanabe, M., Nakamura, Y., Michalak, Z., Isobe, N., Barro, C., Leppert, D., Matsushita, T., Hayashi, F., Yamasaki, R., Kuhle, J., & Kira, J. I. (2019). Serum GFAP and neurofilament light as biomarkers of disease activity and disability in NMOSD. *Neurology*, 93(13), E1299–E1311. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008160>
- Wattjes, M. P., Ciccarelli, O., Reich, D. S., Banwell, B., de Stefano, N., Enzinger, C., Fazekas, F., Filippi, M., Frederiksen, J., Gasperini, C., Hachohen, Y., Kappos, L., Li, D. K. B., Mankad, K., Montalban, X., Newsome, S. D., Oh, J., Palace, J., Rocca, M. A., ... Rovira, A. (2021). 2021 MAGNIMS–CMSC–NAIMS consensus recommendations on the use of MRI in patients with multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 20(8), 653–670. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00095-8)
- Watts, D. J., & Strogatz, S. H. (1998). Collective dynamics of ‘small-world’ networks. *Nature* 1998 393:6684, 393(6684), 440–442. <https://doi.org/10.1038/30918>
- Wekerle, H. (2022). Epstein-Barr virus sparks brain autoimmunity in multiple sclerosis. *Nature*, 7900(603), 1–3. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-00382-2>
- Xue, M., Huang, X., Zhu, T., Zhang, L., Yang, H., Shen, Y., & Feng, L. (2024). Unveiling the Significance of Peroxiredoxin 6 in Central Nervous System Disorders. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 13(4), 449. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX13040449>
- Yang, F., Zhao, L. Y., Yang, W. Q., Chao, S., Ling, Z. X., Sun, B. Y., Wei, L. P., Zhang, L. J., Yu, L. M., & Cai, G. Y. (2024). Quantitative proteomics and multi-omics analysis identifies potential biomarkers and the underlying pathological molecular networks in Chinese patients with multiple sclerosis. *BMC Neurology* 2024 24:1, 24(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S12883-024-03926-3>
- Yang, J., Li, H., Wang, F., Xiao, F., Yan, W., & Hu, G. (2021). Network-Based Target Prioritization and Drug Candidate Identification for Multiple Sclerosis: From Analyzing “Omics Data” to

- Druggability Simulations. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(5), 917–929.
<https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.1C00011>
- Yin, J., & Tian, L. (2014). Optimal linear combinations of multiple diagnostic biomarkers based on Youden index. *Statistics in Medicine*, 33(8), 1426–1440.
<https://doi.org/10.1002/sim.6046>
- Yong, H. Y. F., & Yong, V. W. (2022). Mechanism-based criteria to improve therapeutic outcomes in progressive multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, 18(1), 40–55.
<https://doi.org/10.1038/S41582-021-00581-X>
- Youden, W. J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, 3(1), 32–35.
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:1<32::aid-cnrcr2820030106>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::aid-cnrcr2820030106>3.0.co;2-3)
- Ysraelit, C., & Correale, J. (2018). Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology*, 156(1), 9–22. <https://doi.org/10.1111/imm.13004>
- Yun, H. J., Yoon, J. H., Lee, J. K., Noh, K. T., Yoon, K. W., Oh, S. P., Oh, H. J., Chae, J. S., Hwang, S. G., Kim, E. H., Maul, G. G., Lim, D. S., & Choi, E. J. (2011). Daxx mediates activation-induced cell death in microglia by triggering MST1 signalling. *The EMBO Journal*, 30(12), 2465–2476. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2011.152>
- Yun, H. M., Park, K. R., Kim, E. C., & Hong, J. T. (2015). PRDX6 controls multiple sclerosis by suppressing inflammation and blood brain barrier disruption. *Oncotarget*, 6(25), 20875–20884. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5205>
- Zhan, J., Kipp, M., Han, W., & Kaddatz, H. (2021). Ectopic lymphoid follicles in progressive multiple sclerosis: From patients to animal models. *Immunology*, 164(3), 450–466.
<https://doi.org/10.1111/IMM.13395>
- Zhang, Y., Xie, L., Lu, W., Lv, J., Li, Y., Shao, Y., & Sun, J. (2021). LncRNA MIAT enhances systemic lupus erythematosus by upregulating CFHR5 expression via miR-222 degradation. *Central-European Journal of Immunology*, 46(1), 17–26.
<https://doi.org/10.5114/CEJI.2021.105242>
- Ziemssen, T., & Ziemssen, F. (2005). The role of the humoral immune system in multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Autoimmunity Reviews*, 4(7), 460–467. <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2005.03.005>
- Zlotnik, A., & Yoshie, O. (2012). The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity*, 36(5), 705–716. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.008>
- Zrzavy, T., Hametner, S., Wimmer, I., Butovsky, O., Weiner, H. L., & Lassmann, H. (2017). Loss of “homeostatic” microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain : A Journal of Neurology*, 140(7), 1900–1913.
<https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWX113>
- Zürcher, W. E., Cannon, A. E., Ilchenko, D., Gaitán, M. I., Granberg, T., Piehl, F., Solomon, A. J., & Ineichen, B. V. (2024). Misdiagnosis and underdiagnosis of multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 30(11–12), 1409–1422. <https://doi.org/10.1177/13524585241274527>



OPEN ACCESS

EDITED BY

Robert Weissert,
University of Regensburg, Germany

REVIEWED BY

Fan Yang,
Shanghai Jiao Tong University, China
Shruthi Shanmukha,
Johns Hopkins University, United States

*CORRESPONDENCE

Begoña Oliver-Martos

✉ begoliver@uma.es

Laura Leyva

✉ lleyva@uma.es

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

[‡]These authors have contributed
equally to this work and share
senior and last authorship

RECEIVED 18 February 2025

ACCEPTED 31 July 2025

PUBLISHED 21 August 2025

CITATION

Brichette-Mieg I, Alonso-Torres A,
Aliaga-Gaspar P, Rodríguez-Bada J-L,
Reyes-Garrido V, Urbaneja-Romero P,
Muñoz C, Díaz-Sánchez M,
Martín-Montañez E, Cabello-Porras M-d-R,
Oliver-Martos B and Leyva L (2025) Discovery
and early validation of serum protein
signatures in untreated multiple sclerosis
patients: identification of candidate
biomarkers
for diagnosis and stratification.
Front. Immunol. 16:1579045.
doi: 10.3389/fimmu.2025.1579045

COPYRIGHT

© 2025 Brichette-Mieg, Alonso-Torres,
Aliaga-Gaspar, Rodríguez-Bada, Reyes-Garrido,
Urbaneja-Romero, Muñoz, Díaz-Sánchez,
Martín-Montañez, Cabello-Porras,
Oliver-Martos and Leyva. This is an open-
access article distributed under the terms of
the [Creative Commons Attribution License](#)
(CC BY). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication
in this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Discovery and early validation of serum protein signatures in untreated multiple sclerosis patients: identification of candidate biomarkers for diagnosis and stratification

Isabel Brichette-Mieg^{1,2†}, Ana Alonso-Torres^{1,3†},
Pablo Aliaga-Gaspar^{1,4}, José-Luis Rodríguez-Bada¹,
Virginia Reyes-Garrido^{1,3}, Patricia Urbaneja-Romero^{1,3},
Carmen Muñoz⁵, María Díaz-Sánchez⁶, Elisa Martín-Montañez⁷,
María-del-Rosario Cabello-Porras⁷, Begoña Oliver-Martos^{1,8**}
and Laura Leyva^{1,7**‡}

¹Neuroimmunology and Neuroinflammation Group, Biomedical Research Institute of Málaga-IBIMA Plataforma Bionand, Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, Spain, ²Cellular and Molecular Biology PhD Program, Faculty of Science, University of Málaga, Málaga, Spain, ³Department of Neurology, Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, Spain, ⁴Biomedicine PhD Program, Faculty of Medicine, University of Málaga, Málaga, Spain, ⁵Department of Neurology, Hospital Complejo Torrecárdenas, Almería, Spain, ⁶Department of Neurology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain, ⁷Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Málaga, Málaga, Spain, ⁸Department of Cell Biology, Genetics and Physiology, Physiology Area, Faculty of Science University of Málaga, Málaga, Spain

Background: Despite progress in serum biomarker research, reliable tools for early diagnosis and patient stratification in multiple sclerosis (MS) remain limited. This study uses proteomic profiling in untreated MS patients to identify early disease-associated biomarkers.

Methods: We conducted an unbiased proteomic screen to capture broad serum protein expression profiles in a well-characterized discovery sample: 7 relapsing remitting MS (RRMS), 7 secondary progressive MS (SPMS), 4 with primary progressive MS (PPMS) alongside 6 healthy controls (HC). Twelve candidate biomarkers were subsequently validated by ELISA in an independent sample comprising 80 untreated MS patients (38 RRMS, 21 SPMS, 21 PPMS) and 21 age- and sex-matched HC from southern Spain.

Results: In the discovery phase, 393 proteins were identified; 13 showed significant differences between MS patients and controls and 4 were dysregulated between PPMS and relapsing-onset MS (ROMS). These proteins were involved in immune responses, oxidative stress, and complement regulation. ELISA validation confirmed six differentially abundant proteins (DAPs) in MS patients compared to controls. Among these, BST1 levels were elevated in ROMS ($P_{\text{adj}} = 0.0017$), while FCGR3A showed significant increases in PPMS ($P_{\text{adj}} = 0.034$). PRDX6 levels were consistently elevated in both ROMS ($P_{\text{adj}} = 0.044$) and PPMS ($P_{\text{adj}} = 0.001$), as were APEH levels (ROMS vs. HC: $P_{\text{adj}} = 0.038$; PPMS vs. HC: $P_{\text{adj}} = 0.009$), both correlating with higher disability scores. In contrast, CFHR5 and MST1 levels were significantly reduced in ROMS ($P_{\text{adj}} \leq$