



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA SAN VICENTE MÁRTIR

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud Departamento de Enfermería

**IMPACTO EN EL ESTADO DE
INFLAMACIÓN DE PACIENTES CON
ESCLEROSIS MÚLTIPLE, TRAS
TRATAMIENTO CON
EPIGALOCATEQUINA GALATO Y
ACEITE DE COCO. DISMINUCIÓN DEL
RIESGO CARDÍACO.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por
José Luis Platero Armero

Directores
Dra. María Benlloch García Dr.
Jose Enrique de la Rubia Ortí

2022





A mí familia y prometida



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a Jose Enrique de la Rubia Ortí su confianza puesta en mí, ya que, fue él quien me inició hace 7 años en el apasionante mundo de la investigación, inculcándome sus valores y perfección. Durante este trayecto hemos compartido numerosas historias que nos han unido cada vez más. Eres todo un referente para mí, gracias por todo.

En segundo lugar, y no menos importante, a mi compañera y profesora, Sandra Sancho, por su paciencia y vocación, demostrándome todo su cariño y comprensión, además de su completa disponibilidad y sus valiosos consejos cada vez que han sido necesarios, ¡y que necesarios!. También eres un modelo para mí, gracias por todo.

Y, a María Benlloch, quién a pesar de todas sus objeciones se ha ganado un hueco en mi vida.

A todos los pacientes afectados por esclerosis múltiple, sin los cuales no hubiese sido posible este trabajo de investigación. Espero haberles mejorado sus vidas.

A mis padres y hermano, quiénes han inculcado en mí sus valores, haciéndome ser mejor persona. A pesar de todos los contratiempos, desde el inicio de mis estudios en la universidad, nunca tiraron la toalla y siempre confiaron en mí. Durante estos años me han mostrado su apoyo y su cariño. Nunca pensé que pudiese llegar a ser doctor, pero todos ellos, lo tenían más que asumido.

También me gustaría nombrar a todos mis amigos o compañeros, algunos de ellos sufriendo el inicio y el transcurso de este proyecto. Sin sus consejos y su confianza, no hubiese llegado a esta entrega.

Por último, me gustaría dirigirme a una persona que apareció durante esta andadura, mi prometida. Me gustaría agradecer lo comprensiva que ha sido por no haber pasado más tiempo con ella, dedicándoselo a la tesis o a la investigación. Te has convertido en lo más importante que tengo en esta vida, y todo lo que he hecho, hago y haré, es por ti y por nuestro futuro, espero no defraudarte nunca ni como futuro esposo ni como futuro padre. Y al mismo tiempo, darte las gracias por tanto amor recibido, por tanta ayuda y por demostrarme todos los días, que puedo con aquello que me proponga. Te quiero.



RESUMEN

Marco teórico: la esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurodegenerativa crónica, de carácter inflamatorio, desmielinizante y autoinmune. Entre sus mecanismos patogénicos destaca un alto estrés oxidativo y alteraciones energéticas a nivel mitocondrial que implican a su vez elevados niveles de inflamación; y sintomáticamente cambios antropométricos, caracterizados por disminución de la masa muscular acompañada de aumento de la masa grasa, lo que conllevan incapacidad funcional progresiva. Estos cambios suelen promover la presencia de obesidad, especialmente a nivel abdominal, íntimamente relacionada con la inflamación, y que a su vez implica riesgo de alteraciones cardíacas presentes en muchos de los pacientes.

La administración del polifenol epigallocatequina galato (EGCG); y el aumento en sangre de cuerpos cetónicos (especialmente β HB) tras metabolismo hepático de alimentos ricos en ácidos grasos de cadena media (AGCM) entre los que destaca el aceite de coco, muestran efectos antiinflamatorios y beneficios sobre variables antropométricas y bioquímicas, que disminuyen el riesgo cardiovascular.

Objetivos: como objetivo principal se plantea evaluar el impacto de la intervención de EGCG y aceite de coco en los niveles de inflamación relacionados con la actividad cardíaca de pacientes con EM; y como objetivos secundarios, determinar la posible mejora antropométrica, los cambios en el perfil lipídico y el impacto en el riesgo cardíaco, tras la intervención.

Material y métodos: se realizó un estudio piloto, prospectivo, analítico cuantitativo y experimental mediante un ensayo clínico. La muestra poblacional inicial del estudio fue de 72 pacientes diagnosticados de EM, de los cuales a 57 se les realizó el estudio antropométrico; y finalmente 51 recibieron el tratamiento o placebo durante 4 meses, para lo cual fueron asignados al azar en un grupo control y un grupo intervención. Este último tomó la dosis diaria de 800 mg de EGCG y 60 ml de aceite de coco, mientras que el grupo control recibió un placebo; todos los pacientes del estudio siguieron una dieta isocalórica de naturaleza mediterránea, adaptada individualmente. Antes y después de la intervención se midieron: variables antropométricas, permitiendo detectar la presencia de obesidad abdominal y riesgo cardíaco; diferentes marcadores en sangre como: niveles de β HB, lipoproteínas (como colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y baja densidad (LDL), apolipoproteína A-1 (APOA-1) o triglicéridos (TG)), haptoglobina



(Hp), proteína C reactiva (PCR), actividad de la paraoxonasa 1 (PON1), butirilcolinesterasa (BuChE), albúmina, cortisol, e interleuquina 6 (IL-6); y la Escala Expandida de Estado de Discapacidad (EDSS) que determina la capacidad funcional.

Resultados: a nivel antropométrico, el 87,7% de los pacientes con EM presentan obesidad abdominal, los cuales además presentan un índice de masa corporal (IMC), porcentaje de grasa corporal, circunferencia de la cintura, ratio cintura cadera (RCC) y ratio cintura altura (RCA) significativamente más altos que los pacientes sin obesidad abdominal. Además, la IL-6 es significativamente más alta en los pacientes con obesidad abdominal (mientras que no existen diferencias en los valores medios de la actividad de PON1), y muestra una correlación significativa y positiva con la circunferencia de la cintura y RCA. Tras el tratamiento, se observó únicamente en el grupo intervención una disminución significativa del porcentaje de grasa, RCC y el peso de grasa; y un aumento significativo del porcentaje de masa muscular. Y en cuanto a los biomarcadores, únicamente en el grupo intervención aumentó significativamente en sangre: β HB, BuChE, la actividad de PON 1 y la albúmina; y la IL-6 y los triglicéridos disminuyeron significativamente (al igual que EDSS, lo que representa una mejora en la capacidad funcional). Mientras que en el grupo control solo disminuyó IL-6. El cortisol no mostró cambios para ninguno de los grupos. Además, la BuChE únicamente correlaciona significativa y positivamente en el grupo intervención con los porcentajes de masa grasa, los niveles de TG en sangre y la actividad de PON1. También, y a pesar de que las mejoras musculares solo se dan en el grupo intervención, y que Hp muestra correlación significativa y positiva con los niveles de IL-6 y negativa con el porcentaje de músculo previa a la intervención, los niveles de Hp en la sangre no variaron en este grupo. En cuanto a las lipoproteínas en sangre, el CT aumento significativamente en ambos grupos, HDL aumentó solo en el grupo control, y los TG, que muestran diferencia tendencia entre los grupos (con incremento en el grupo control y disminución en el de intervención), tras análisis como muestras independientes mostró diferencias significativas con niveles más bajos en el grupo intervención. Además, solo en el grupo intervención, los TG correlacionan significativamente con los valores de EDSS de manera positiva, y a su vez estos valores de EDSS correlaciona significativa y positivamente con los valores de PCR en sangre, lo que parece indicar la relación de los niveles elevados de TG e inflamación con la capacidad funcional.



Finalmente, y posiblemente como consecuencia de estos cambios antropométricos y moleculares, se pudo observar una mejora en el riesgo cardíaco únicamente en el grupo intervención, disminuyendo el número de pacientes de alto riesgo y aumentando el de moderado o bajo riesgo.

Conclusiones: los pacientes de EM presentan obesidad abdominal asociada a mayor inflamación. La intervención de EGCG y aceite de coco en pacientes con EM parece disminuir el estado de inflamación característico de la enfermedad, lo que podría explicar a su vez la disminución en el riesgo cardíaco. Esto podría deberse a una mejora antropométrica, con incremento de masa muscular y disminución de masa grasa. En estos cambios, BuChE parece tener un papel en el aumento de la actividad lipolítica, mientras que la albúmina y Hp podrían representar roles en: disminución de grasa abdominal, y regeneración muscular asociada con mejora en el nivel de inflamación, respectivamente.

Palabras clave: Esclerosis múltiple, inflamación, riesgo cardíaco, epigallocatequina galato, aceite de coco.



ABSTRACT

Theoretical framework: Multiple Sclerosis (MS) is a chronic neurodegenerative, inflammatory, demyelinating, and autoimmune disease. Among its pathogenic mechanisms, high oxidative stress and energy alterations at the mitochondrial level stand out, which in turn imply elevated levels of inflammation; and symptomatically anthropometric changes, characterized by a decrease in muscle mass accompanied by an increase in fat mass, which leads to progressive functional disability. These changes often promote the presence of obesity, mainly abdominal, which is closely related to inflammation, which in turn implies the risk of cardiac alterations, present in many patients.

The administration of polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG); and the increase in ketone bodies blood levels (specially β HB) after hepatic metabolism of foods rich in medium-chain fatty acids (MCFA), among which coconut oil stands out, show antiinflammatory effects and benefits on anthropometric and biochemical variables, which reduce cardiovascular risk.

Objectives: the main objective is to assess the impact of EGCG and coconut oil intervention in inflammation levels related to cardiac activity in MS patients; and as secondary objectives, to determine the possible anthropometric improvement, changes in the lipid profile and the impact on cardiac risk after the intervention.

Material and methods: a pilot, prospective, analytic, quantitative, and experimental study was carried out by means of a clinical trial. The initial population sample of the study was 72 patients diagnosed with MS, of which 57 underwent an anthropometric study; and finally, 51 received the treatment or placebo for 4 months, for which they were randomly assigned to a control group and an intervention group. The latter took the daily dose of 800 mg of EGCG and 60 ml of coconut oil, whereas the control group received a placebo; all patients in the study followed an individually adapted isocaloric diet of Mediterranean nature. Before and after the intervention were measured: anthropometric variables, allowing to detect the presence of abdominal obesity and cardiac risk; different markers in blood such as: β -hydroxybutyrate (β HB) levels, lipoproteins (such as total cholesterol (CT), high-density lipoproteins (HDL), low-density lipoproteins (LDL), Apolipoprotein A-1 (APOA-1) and triglycerides (TG)), haptoglobin (Hp), C-reactive protein (CRP), paraoxonase 1 (PON1), butyrylcholinesterase (BuChE), albumin, cortisol



and interleukin 6 (IL-6); and the Expanded Disability Status Scale (EDSS) which determines functional capacity.

Results: at the anthropometric level, 87.7% of MS patients present abdominal obesity, who also present significantly higher a body mass index (BMI), body fat percentage, waist hip ratio (WHR) and waist height ratio (WHtR) than patients without abdominal obesity. In addition, IL-6 is significantly higher in patients with abdominal obesity (while there are no differences in the mean values of PON1 activity) and shows a significant and positive correlation with waist circumference and WHtR. After treatment, a significant decrease in fat percentage, WHR and fat weight; and an increase in muscle mass was only observed in the intervention group. And as for biomarkers, just in the intervention group significantly increased in blood: β HB, BuChE, PON1 activity and albumin; and IL-6 and triglycerides decreased significantly (as did EDSS, which represents an improvement in functional capacity). Whereas in control group only IL-6 decreased. Cortisol did not show changes in either group. Furthermore, BuChE only correlated significantly and positively in the intervention group with fat mass percentages, blood TG levels and PON1 activity. Also, and despite the fact that muscle improvements only occur in the intervention group, and that Hp shows a significant and positive correlation with IL-6 levels and negative correlation with pre-intervention muscle percentage, Hp levels in blood did not change in this group. As far as lipoproteins in blood are concerned, CT significantly increased in both groups, HDL increased only in control group, and TG, which showed a different trend between both groups (with increase in control group and decrease in intervention group), after the analysis as independent samples showed significant differences with lower levels in the intervention group. Moreover, just in the intervention group, TG significantly and positively correlated with EDSS values, and in turn, these EDSS values significantly and positively correlated with CPR values in blood, which seems to indicate the relation of elevated TG and inflammation levels with functional capacity.

Finally, and possibly as a consequence of these anthropometric and molecular changes, an improvement in cardiac risk could be observed only in the intervention group, with a decrease in the number of high-risk patients and an increase in those at moderate or low risk.

Conclusions: MS patients show abdominal obesity associated with increased inflammation. The intervention with EGCG and coconut oil in MS patients seems to



decrease the inflammatory state characteristic of the disease, which could explain the decrease in cardiac risk. This could be due to an anthropometric improvement, with increased muscle mass and decreased fat mass. In this changes, BuChE seems to play a role in the increase of lipolytic activity, while albumin and Hp could play roles in: decrease in abdominal fat, and muscular regeneration associated with improvements in inflammation levels, respectively.

Key words: multiple sclerosis, inflammation, cardiac risk, epigallocatechin gallate, coconut oil.



ÍNDICE

CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	1
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. DEFINICIÓN DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM)	4
1.2. INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM)	5
1.3. CLASIFICACIÓN DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM)	5
1.4. CAUSAS ETIOLÓGICAS Y FACTORES DE RIESGO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM)	6
1.5. MECANISMOS PATOGENÉTICOS EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM)	7
1.5.1. Estrés oxidativo	7
1.5.2. Alteraciones mitocondriales	9
1.5.3. Inflamación. Interleuquina 6 (IL-6)	9
1.6. SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM)	11
1.7. ALTERACIONES CARDÍACAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	12
1.7.1. Dislipemia y alteraciones cardíacas	12
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	13
Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	13
Triglicéridos (TG)	14
1.7.2. Cambios antropométricos y alteraciones cardíacas	14
• Tejido muscular	15
Haptoglobina (Hp)	15
Proteína C reactiva (PCR)	17
• Tejido adiposo	17
Paraoxonasa 1 (PON1)	18
Butirilcolinesterasa (BuChE)	19
Albúmina	21
Cortisol	23
1.8. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM)	25
1.9. TRATAMIENTOS NO FARMACOLÓGICOS PARA LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM)	26



1.9.1. Polifenoles. Epigallocatequina galato (EGCG)	26
Epigallocatequina galato (EGCG) y mejoras antropométricas	30
Epigallocatequina galato (EGCG) y mejoras en el riesgo cardíaco	31
1.9.2. Triglicéridos de cadena media (TGCM). Aceite de coco	31
Aceite de coco y mejoras antropométricas	35
Aceite de coco y mejoras del riesgo cardíaco	37
CAPÍTULO II	39
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
2.1. HIPÓTESIS	39
2.1.1. Hipótesis principal	39
2.1.2. Hipótesis secundarias	39
2.2. OBJETIVOS	39
2.2.1. Objetivo principal (OP)	39
2.2.2. Objetivos secundarios (OSs)	40
CAPITULO III	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS	41
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	41
3.2. MUESTRA POBLACIONAL	41
3.3. PROCEDIMIENTO	43
3.4. INTERVENCIÓN	43
3.5. MEDICIONES	44
3.5.1. Mediciones antropométricas	44
3.5.2. Análisis de sangre y marcadores	45
3.5.3. Escala Expandida de Estado de Discapacidad (EDSS)	46
3.6. CONSIDERACIONES ÉTICAS	46
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
CAPÍTULO IV	49
4. RESULTADOS	49
4.1. CAMBIOS ANTROPOMÉTRICOS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM), TRAS TRATAMIENTO CON EPIGALOCATEQUINA GALATO (EGCG) Y ACEITE DE COCO (OS 1)	49



Obesidad abdominal. Relación con la interleuquina 6 (IL-6)	50
Cambios antropométricos	53
Butirilcolinesterasa (BuChE)	57
Albúmina-cortisol	58
Haptoglobina (Hp)	59
4.2. CAMBIOS EN EL PERFIL LIPÍDICO EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM), TRAS TRATAMIENTO CON EPIGALOCATEQUINA GALATO (EGCG) Y ACEITE DE COCO (OS 2)	60
Triglicéridos (TG)	62
4.3. IMPACTO DE LA INTERVENCIÓN CON ACEITE DE COCO Y EGCG EN EL RIESGO CARDÍACO (OS 3)	64
CAPÍTULO V	67
5. DISCUSIÓN	67
5.1. MEJORA ANTROPOMÉTRICA EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM), TRAS TRATAMIENTO CON EPIGALOCATEQUINA GALATO (EGCG) Y ACEITE DE COCO (OS 1)	67
Obesidad abdominal. Relación con la interleuquina 6 (IL-6)	67
Cambios antropométricos	69
Butirilcolinesterasa (BuChE)	70
Albúmina-cortisol	71
Haptoglobina (Hp)	72
5.2. CAMBIOS EN EL PERFIL LIPÍDICO EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM), TRAS TRATAMIENTO CON EPIGALOCATEQUINA GALATO (EGCG) Y ACEITE DE COCO (OS 2)	74
5.3. IMPACTO DE LA INTERVENCIÓN DE EPIGALOCATEQUINA GALATO (EGCG) Y ACEITE DE COCO EN EL RIESGO CARDÍACO (OS 3)	77
CAPÍTULO VI	81
6. CONCLUSIONES	81
CAPÍTULO VII	83
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
CAPÍTULO VIII	115
8. ANEXOS	115
8.1. COMITÉ DE ÉTICA	115
8.2. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS CON FACTOR DE IMPACTO	116



8.2.1. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS SIN FACTOR DE IMPACTO	122
8.3. CAPÍTULOS DE LIBRO	123
8.4. COMUNICACIONES ORALES	124
8.5. PÓSTERS	126
8.6. PREMIOS OBTENIDOS	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores antropométricos de la muestra poblacional de pacientes con esclerosis múltiple (EM)	49
Tabla 2. Niveles en sangre de biomarcadores de inflamación y oxidación vinculados al estado antropométrico, determinados en la muestra poblacional de pacientes con esclerosis múltiple (EM)	50
Tabla 3. Comparación de variables antropométricas entre pacientes con o sin obesidad abdominal	51
Tabla 4. Comparación de los niveles en sangre de marcadores bioquímicos entre pacientes con o sin obesidad abdominal	52
Tabla 5. Correlaciones de la interlequina 6 (IL-6) con variables antropométricas y paraoxonasa 1 (PON1)	52
Tabla 6. Características sociodemográficas de la población de estudio (grupo control y grupo intervención)	53
Tabla 7. Niveles en sangre de marcadores bioquímicos de la población antes de la intervención (pre-test)	54
Tabla 8. Cambios antropométricos tras la intervención, tanto en el grupo intervención como en el control (mediciones Pre y Post)	55
Tabla 9. Comparación de las puntuaciones de cambio de las variables antropométricas post intervención, tanto en el grupo intervención como en el control	56
Tabla 10. Comparación de las puntuaciones pre-post intervención, tanto en el grupo intervención como en el grupo control	57
Tabla 11. Correlación en el estudio entre butirilcolinesterasa (BhChE) y las otras variables tras la intervención (post-test), tanto en el grupo intervención como en el control	58



Tabla 12. Comparación antes del tratamiento (pre) y después (post) de los valores de albúmina y cortisol entre los grupos control e intervención	59
Tabla 13. Correlaciones de haptoglobina con interleuquina 6 (IL-6) y porcentaje de masa muscular (% muscular), antes (pre) y después (post) de la intervención	60
Tabla 14. Parámetros lipídicos al inicio del estudio tanto en el grupo intervención como en el control	60
Tabla 15. Comparativa entre los grupos control e intervención tras el tratamiento, de los valores obtenidos en las diferentes variables relacionadas con el riesgo cardíaco	64
Tabla 16. Comparativa entre los grupos control e intervención tras el tratamiento, en los niveles de riesgo cardíaco	65
Tabla 17. Comparación de las puntuaciones de cambio después de la finalización de la intervención versus el control	66



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curso de la Esclerosis Múltiple (EM) con altos niveles de inflamación caracterizados por un aumento de interleuquina 6 (IL-6) de los que, a su vez, depende la expresión de Haptoglobina (Hp)	16
Figura 2. Mecanismo inflamatorio ligado a la esclerosis múltiple (EM) en el que interviene butirilcolinesterasa (BuChE), que se expresa principalmente por neuronas y acetilcolina (Ach) hidrolizada	20
Figura 3. Interacción de la interleuquina 6 (IL-6) con la albúmina	22
Figura 4. Acción del cortisol en el adipocito	24
Figura 5. Clasificación de los polifenoles	28
Figura 6. Estructura química de la Epigallocatequina galato (EGCG)	29
Figura 7. Metabolismo y absorción tanto de los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) como de los ácidos grasos de cadena media (AGCM)	32
Figura 8. Diferentes partes del coco.	33
Figura 9. Composición por cada 100 gr de aceite de coco convencional	35
Figura 10. Conversión de acetil-CoA en betahidroxibutirato (β HB)	36
Figura 11. Diagrama de flujo que se siguió para la obtención de la muestra poblacional que formo parte del estudio	42
Figura 12. Cambios obtenidos en el grupo intervención en los niveles de Haptoglobina (Hp) y porcentaje de músculo, al comparar las variables antes (pre) y después (post) de la intervención	59
Figura 13. Perfil lipídico antes y después de la intervención en los grupos control e intervención	62
Figura 14. Correlaciones entre la actividad funcional (valores escala EDSS) y los niveles de triglicéridos (TG) después de la intervención, en los grupos control e intervención	63
Figura 15. Correlaciones entre la actividad funcional (valores escala EDSS) y los niveles de Proteína C reactiva (PCR) después de la intervención, en los grupos control e intervención.	63
Figura 16. Comparativa del porcentaje de pacientes con riesgo cardíaco bajo, moderado o alto, antes del tratamiento (pre test) y después del tratamiento (post-test), entre los grupos control (azul) e intervención (rosa).	65

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



Ach	Acetilcolina
ACTH	Adenocorticotrópica
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGCL	Ácidos Grasos de Cadena Larga
AGCM	Ácidos Grasos de Cadena Media
AGS	Ácidos Grasos Saturados
APOA-1	Apolipoproteína A1
ATP	Adenosín Trifosfato
bHB	Beta-Hidroxibutirato
BHE	Barrera hematoencefálica
11b-HSD11	11 β -hidroesteroide deshidrogenasa tipo 1
BuChE	Butirilcolinesterasa
CIS	Síndrome Clínicamente Aislado
CRH	Corticotropina
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDSS	Escala Expandida del Estado de Discapacidad
EGCG	Epigallocatequina Galato
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EM	Esclerosis Múltiple
EMPP	Esclerosis Múltiple Progresiva-Primaria
EMPS	Esclerosis Múltiple Progresiva-Secundaria
EMRR	Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente
EN	Enfermedad neurodegenerativa
ERO	Especie Reactiva de Oxígeno
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
Fe	Hierro
GBP	Proteína de unión a la globulina
GC	Glucocorticoides
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HCA	Receptores Ácido Hidroxicarboxílico



HDL	Lipoproteína de alta densidad
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
Hp	Haptoglobina
HPA	Hipotalámico-Pituitario-Adrenal
IL-6	Interleuquina 6
IMC	Índice de Masa Corporal
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Mg	Magnesio
NADPH	Nicotianida-Adenina-Dinucleotido fosfato
OMS	Organización Mundial de la Salud
OP	Objetivo principal
OS	Objetivo secundario
PCR	Proteína C reactiva
PON1	Paraoxonasa 1
PPA	Proteína Precursora Amiloide
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SOD	Superóxido Dismutasa
TGCL	Triglicéridos de Cadena Larga
TGCM	Triglicéridos de Cadena Media
TME	Terapia Modificadora de Enfermedad
TNF-a	Factor Necrosis Tumoral
VEB	Virus Epstein-Bar



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Mediante la presente tesis doctoral, se pretende profundizar en el impacto de un tratamiento neuroprotector, en la relación existente entre la inflamación y la esclerosis múltiple (EM), vinculada a su vez al riesgo cardíaco. En cuanto al tratamiento objeto de nuestro análisis, cabe destacar que se basó en una asociación de 2 moléculas complementarias que se seleccionaron a partir de estudios previos en modelo clínico y modelo animal de la enfermedad. Concretamente, por una parte, se seleccionó la catequina Epigallocatequina galato (EGCG) por su eficacia antioxidante y antiinflamatoria; y por otra, siguiendo la línea de actuación de nuestro grupo intervención en estudios previos para enfermedades como Alzheimer o esclerosis lateral amiotrófica (ELA), el aceite de coco, como fuente más importante a nivel nutricional de cuerpos cetónicos en sangre (destacando a betahidroxibutirato (β HB) al tratarse del más activo). Esta asociación podría representar un complemento a los tratamientos farmacológicos actuales para la enfermedad al frenar el elevado estrés oxidativo, gracias principalmente a la actividad ya reportada del polifenol; y al mejorar las alteraciones energéticas a nivel mitocondrial mostradas en la enfermedad, debido a la actividad beneficiosa de los cuerpos cetónicos en la mejora del funcionamiento de la cadena de electrones.

Para determinar la eficacia del tratamiento, se llevará a cabo una cuantificación y valoración de diversos biomarcadores y variables antropométricas. Concretamente se medirán en sangre hasta 11 biomarcadores que se vincularán, por un lado, precisamente a los posibles cambios antropométricos de los pacientes, y, por otro lado, a las variaciones en el perfil lipídico; que a su vez podrían tener una repercusión directa en el elevado riesgo cardíaco que caracteriza a esta población.

Estas valoraciones también servirán para profundizar en la comprensión de la fisiopatología de la EM, en la que se está evidenciando precisamente la existencia de alteraciones lipídicas vinculadas a alteración en los niveles de marcadores inflamatorios, y que podrían ser



consecuencia de la ganancia de masa grasa que desarrollan los pacientes y que acompaña al deterioro muscular.

Para llevar a cabo este estudio, se obtuvo una población de pacientes de EM representativa de lo que se acepta en la actualidad para la enfermedad en cuanto a: edad media, ratio entre mujeres y hombres, y proporcionalidad de los diferentes tipos de EM. Estos participantes se distribuyeron aleatoriamente en grupo intervención y grupo control. El ensayo tuvo una duración de 4 meses, obteniéndose y realizándose justo antes y después: las muestras sanguíneas (para la cuantificación posterior de biomarcadores) y determinaciones funcionales y antropométricas respectivamente.

La importancia que presenta esta tesis y, por tanto, lo que justifica su realización, es el abordaje de la fisiopatología precisamente a partir del conocimiento previo de los principales mecanismos patogénicos de la enfermedad que conducen fundamentalmente a un proceso inflamatorio, vinculado a su vez a cambios antropométricos que tienen un impacto directo en la discapacidad funcional progresiva y que influye de manera decisiva en la calidad de vida de los pacientes y en su estado emocional. Para ello se emplearán cantidades de EGCG nunca antes administradas a nivel clínico, así como un elevado volumen de aceite de coco diario; tratando de obtener una cetosis, ya observada como beneficiosa para otras enfermedades que cursan con neurodegeneración. Este tratamiento, cabe destacar que se integrará en una dieta base de naturaleza mediterránea, adaptada a las necesidades individuales de cada paciente y que recibieron también los pacientes del grupo control a los que se les administrará placebo. Cabe destacar, que, dadas las enormes propiedades beneficiosas de este tipo de dieta (fundamentalmente a nivel inflamatorio, en la dislipemia y a nivel cardíaco objetos del estudio), algunas de las mejoras se pueden esperar también en el grupo placebo.

En cuanto a la idoneidad de la realización de esta tesis doctoral por un enfermero, hay que destacar que estos profesionales actualmente están formando parte en la mayoría de los estudios multidisciplinares que se realizan. Los enfermeros, son quizás de los profesionales del área de la salud más cualificados, dada su diversidad formativa, para la extracción, procesamiento y análisis de muestras biológicas. Además, dadas las competencias que actualmente tienen en su formación, también poseen la capacidad para valorar e interpretar los resultados de estos análisis. A esto, hay que añadir el contacto directo con el paciente, plenamente empático, ya que entienden el proceso de angustia que presenta el enfermo diagnosticado de una enfermedad crónica que no



tiene cura. Cabe recordar, que la EM es la enfermedad incapacitante más prevalente en personas jóvenes, y que esta prevalencia va en aumento.

Con el fin de lograr los objetivos que se plantean en este estudio, la tesis se estructura en tres grandes bloques. El primero de ellos (capítulo I) desarrolla la evidencia teórica que justifica el tratamiento empleado; para ello, partiendo de las características de las principales enfermedades neurodegenerativas, profundiza en todos los aspectos etiológicos, patogénicos y clínicos de la EM, para acabar abarcando la justificación teórica del tratamiento basado en la administración del aceite de coco y de la EGCG.

En segunda parte (capítulos II, III y IV) se desarrolla la metodología del trabajo de investigación, estableciendo los objetivos principales y secundarios; y los resultados obtenidos que se muestran en el mismo orden que los objetivos, para mayor comprensión y seguimiento del estudio.

En el tercer bloque (capítulo V), igualmente de manera cronológica en relación a los objetivos, se discuten los principales resultados y se ponen de manifiesto las principales limitaciones que tiene el estudio, así como las futuras líneas de trabajo como una continuación de la tesis.

Finalmente, se muestran las conclusiones (capítulo VI) a partir de los objetivos planteados y de las hipótesis de partida.

1. MARCO TEÓRICO

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) se están posicionando como uno de los principales problemas de salud pública, debido a su alta incidencia (1). Se caracterizan por presentar degeneración de las células neuronales de modo crónico; y actualmente no tienen cura médica, existiendo únicamente tratamientos que consiguen aminorar el proceso degenerativo (2). Todas ellas se manifiestan con una agregación de proteínas, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y neuroinflamación (2-4). En este sentido, cabe mencionar la predisposición del cerebro a desarrollar este tipo de patologías degenerativas principalmente como consecuencia del daño oxidativo, relacionado de manera directa con la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN). Este estrés oxidativo se debe, a su vez, al alto consumo de oxígeno por parte de las neuronas, que presentan un mayor número de mitocondrias respecto a otros tipos de células (5). Como consecuencia, las neuronas se caracterizan por su



constante demanda energética, lo que las hace especialmente vulnerables a una alteración en el metabolismo energético (2-3).

Este grupo de enfermedades abarca diversas patologías, destacando entre ellas por su prevalencia e incidencia: la enfermedad de Alzheimer (EA); la enfermedad de Parkinson; y la EM, que se distingue y caracteriza a su vez por ser la segunda causa de discapacidad en la gente joven por detrás de los accidentes de tráfico, de ahí la importancia de avanzar en su prevención y tratamiento.

1.1. Definición de la esclerosis múltiple (EM)

En 1868, el profesor de neurología Jean-Martin Charcot examinó el cerebro de una mujer fallecida, que había experimentado los mismos síntomas que ya habían sido recogidos en la literatura de la época. Fue en esta fecha cuando se acuñó como una enfermedad, siendo los principales síntomas descritos: la disartria, ataxia y la presencia de temblores (6-7).

La EM es una enfermedad crónica, de naturaleza inflamatoria y autoinmune del sistema nervioso central (SNC), que cursa con neurodegeneración progresiva. Este daño neuronal se basa principalmente en el elevado estrés oxidativo e inflamación a nivel central, lo que afecta a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), permitiendo que células T autorreactivas, linfocitos B, macrófagos y células microgliales accedan y dañen especialmente la materia blanca del cerebro y la médula espinal (8-10).

Como consecuencia de estos eventos, la característica principal de dicha enfermedad es la presencia de grandes lesiones en las vainas de mielina del SNC en la sustancia blanca y en la gris. Estas lesiones van destruyendo progresivamente dichas vainas de mielina, cuya función es recubrir los axones, permitiendo de este modo que la conducción de la corriente eléctrica se produzca de manera adecuada (11).

Este proceso conlleva gran inflamación, ya que está asociado a la expresión de citoquinas proinflamatorias y diferentes conjuntos de linfocitos y monocitos. Es por esto que las lesiones ocurren en un contexto de inflamación que se inicia alrededor del torrente sanguíneo. Por ello, se puede apreciar lesión en las vainas, que va desde el borde, hacia la parte más interna a medida que progresa la enfermedad. Este patrón de afectación perivenosa dónde se produce una



desmielinización neuronal, caracteriza a la enfermedad de EM permitiendo ser diferenciada de otras patologías mediante pruebas radiológicas (12).

1.2. Incidencia y prevalencia de esclerosis múltiple (EM)

La EM se considera como el principal trastorno neurológico del mundo, siendo la causa más común discapacidad neurológica en los jóvenes (13).

La epidemiología de la enfermedad está cambiando de forma brusca en varias regiones del mundo. En este sentido se ha establecido una posible correlación entre la latitud y la presencia de la enfermedad. Sin embargo, no se ha podido determinar una distribución geográfica, pudiéndose observar, conforme avanzan las actualizaciones en los datos de prevalencia, que esta patología es cada vez más prevalente en todo el mundo. Además de ello se puede destacar que la frecuencia también es más alta cada vez, siendo característico el aumento de casos al revisar la demografía de la enfermedad (14).

La organización mundial de la salud (OMS) en 2008 determinó que la prevalencia de la enfermedad se situaba en 30 por cada 100.000 personas a nivel mundial. Cuando se realizó una revisión más actual en 2013 a través del mismo organismo, se observó que la prevalencia había aumentado situándose en 33 por cada 100.000, constituyendo un total de 2,3 millones de personas que padecen la enfermedad (11). En la actualidad, la prevalencia mundial de la enfermedad se estima que es de 35,9 por cada 100.000 personas, afectando a un total de 2,8 millones de personas (15). España está considerada como una región de prevalencia media-alta con cifras que oscilan desde los 80-180 casos por cada 100.000 persona (16).

En cuanto a la edad, el diagnóstico más habitual se produce entre los 20 y 40 años; siendo la prevalencia más elevada en las mujeres que en los hombres, ya que el riesgo para el sexo femenino es dos veces superior al masculino, destacando cómo la ratio mujer: hombre en regiones como el sur de España se haya establecido en 3:1 (14).

1.3. Clasificación de la esclerosis múltiple (EM)



Se trata de una enfermedad fluctuante que se clasifica principalmente según los síntomas clínicos. En función de ellos se aceptan cuatro fenotipos (17):

Síndrome clínicamente aislado (CIS): se trata de una primera aparición de la clínica, pero no logra alcanzar la suficiente intensidad para ser diagnosticado como EM. Suele presentarse como síntomas monofocales, que evolucionan de forma aguda y se resuelven en menos de 24h horas (18).

EM remitente-recurrente (EMRR): se considera el estado más común para todos los pacientes con EM. Se caracteriza por presentar periodos alternos de disfunción neurológica, y momentos de estabilidad clínica sin síntomas. La frecuencia entre los periodos suele variar entre los pacientes. Cada periodo de recaída da lugar a déficits residuales lo que promueve un deterioro progresivo (19).

EM progresiva primaria (EMPP): se trata de un subtipo poco común en el que los pacientes no padecen el fenotipo anterior, sino que presentan una progresión constante desde el inicio de la enfermedad (20).

EM progresiva secundaria (EMPS): este subtipo es considerado el antecesor de la fase EMRR. Fenotípicamente el curso no es uniforme; consiste en periodos de progresión acompañados de posibles recaídas superpuestas. Como principal característica, resaltar que se trata de una etapa con un grado de inflamación persistente acompañada de disfunción mitocondrial y neurodegeneración (21).

1.4. Causas etiológicas y factores de riesgo de la esclerosis múltiple (EM)

Actualmente se desconoce la etiología de la EM; sin embargo, se ha logrado identificar varios factores de riesgo, ya sean ambientales o genéticos. En este sentido cabe destacar especialmente, como ya se ha indicado, que afecta mayormente a las mujeres (14). Profundizando sobre todas las variables ambientales y genéticas, a continuación, se presentan las que han sido descritas hasta el momento en la literatura científica:

Genéticas. La mayoría de enfermedades autoinmunes vienen asociadas con una región del antígeno leucocitario humano (HLA), en especial los genes de HLA de la clase II y I. Se ha



estimado que aquellos individuos con una alteración en dichos genes, poseen un mayor riesgo de padecer la enfermedad (22,23).

Virus Epstein-Barr (VEB). Se ha demostrado de forma reciente que aquellas personas que han manifestado clínicamente la enfermedad o contagio por el VEB a lo largo de su vida, tienen el doble de riesgo de padecer EM (24); y concretamente, se ha descrito cómo padecer una infección por dicho virus durante la adolescencia es especialmente relevante a la hora de aumentar probabilidad de desarrollar la patología. El mecanismo por el cual el VEB podría influir en la aparición de EM sigue siendo desconocido. Una de las posibles explicaciones es por su mimetismo molecular, pues las secuencias proteicas de VEB calcan las proteínas de las vainas de mielina, induciendo autoinmunidad contra estas últimas. Aquellos pacientes que desarrollan EM suelen estar casi todos infectados con VEB; el hecho de que solamente unos pocos expresen la enfermedad podría explicarse por la susceptibilidad genética (25).

Tabaquismo. Se puede señalar que el tabaquismo establece un perfil proinflamatorio a nivel pulmonar, lo que podría conducir a un daño inmunológico en el SNC. Es por ello que además de aumentar el riesgo de padecer EM, el consumo de tabaco altera la eficacia de muchos fármacos basados en tratar de neutralizar ciertos anticuerpos vinculados directamente con el desarrollo de la enfermedad. Además, el tabaco posee capacidad de interactuar con los genes asociados a la EM, por lo que interesantemente el efecto que puede producir el tabaquismo depende en gran medida de la expresión genética (24,26).

Vitamina D/exposición solar. Como se ha indicado anteriormente, numerosos estudios señalan una posible relación entre la latitud y contraer la enfermedad. Dicha correlación viene sustentada por la exposición solar. Es sabido que en función de la latitud en la que se encuentre un individuo, se va a recibir mayor o menor índice de rayos ultra violetas. Estos rayos son de vital importancia para la conversión de la vitamina D, en un compuesto activo y por tanto utilizable por el organismo. Es diversa la literatura que recoge la disminución del riesgo de padecer EM con unos niveles altos de calcitriol, ya sean obtenidos mediante exposición solar, suplemento nutricional o ingesta de dietas ricas en la vitamina (27-29).

Obesidad. Esta condición nutricional se correlaciona con el riesgo de padecer EM dada su interacción a nivel genético con el gen HLA, ya descrito anteriormente como determinante en la EM (22).



1.5. Mecanismos patogénicos en esclerosis múltiple (EM)

Entre los diversos mecanismos patogénicos que se manejan actualmente para la enfermedad, destacan los siguientes.

1.5.1. Estrés oxidativo

Durante la respiración mitocondrial se produce la fosforilación oxidativa de adenosín trifosfato (ATP), que da como resultado la generación de ERO y ERN, que son consideradas esenciales para el funcionamiento neuronal ya que desempeñan un papel importante en la señalización celular. Este proceso viene definido por la regularización de ciertos componentes que afectan a diversas etapas celulares (30). Sin embargo, cuando existen niveles excesivos de estas especies, pueden resultar nocivos para nuestro sistema nervioso (SN). En condiciones normales el cerebro tiene la capacidad de regular eficazmente su estado oxidativo, neutralizando especialmente las especies ERO. Pero cuando la producción de ERO resulta excesiva, se supera la capacidad del órgano para eliminarla, y es cuando se produce una oxidación extensa que provoca un daño oxidativo y deterioro neuronal. En el cerebro existen dos vías de protección para hacer frente al acúmulo de ERO: el sistema de enzimas antioxidantes (como la superóxido dismutasa (SOD)) y los antioxidantes de bajo peso molecular (31). Dentro de estas dos vías de eliminación de especies ERO, destaca la actividad de la SOD, que es una enzima con tres isoformas (SOD1, SOD2, SOD3) con diferentes localizaciones celulares (30). Su función es catalizar la eliminación de especies ERO mediante una reacción en la que se produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esto es importante siempre y cuando el resultado de la reacción producida por SOD se elimine correctamente a través de la acción de la catalasa, ya que puede ocurrir que se sobreproduzca H_2O_2 , lo que puede conducir a una muerte celular (32).

En lo relativo a la EM, cabe destacar a nivel patogénico precisamente el elevado estrés oxidativo, basado principalmente en la presencia de ERO. Dichas especies desencadenan una gran variedad de cascadas moleculares que aumentan la permeabilidad de la BHE, alterando la morfología del cerebro y desencadenando la muerte neuronal. Como consecuencia, las ERO promueven lesiones inflamatorias locales, que más tarde desencadenan un trastorno mitocondrial causando una neurodegeneración e incluso una retroalimentación positiva, lo que se traduce en un mayor estrés oxidativo (33).



Por tanto, una presencia excesiva de ERO vinculada a la disfunción de las mitocondrias, puede inducir daño irreversible de las mismas. En este sentido cabe destacar que las mitocondrias son un objetivo principal de ERO; concretamente el ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial, por lo que son especialmente sensibles al daño oxidativo, pues carecen de una alta capacidad de reparación. Además, las ERO mitocondriales gozan del poder oxidativo de ciertas proteínas pertenecientes a la cadena de electrones, afectando así a la respiración mitocondrial (30). Por ello, las neuronas susceptibles a la neurodegeneración necesitan una mayor energía para poder mantener sus funciones y su integridad estructural, y una interrupción en el suministro energético puede conducir a un estrés oxidativo celular que acelera el proceso de apoptosis (2).

En cuanto al estrés oxidativo en EM, también es importante tener en cuenta la desmielinización que se produce (34-35); al tratarse de una enfermedad de origen inflamatorio se produce una migración celular y la consiguiente activación del sistema inmunológico. Los niveles elevados de ERO, como ya se ha indicado, son capaces de modificar la BHE afectando así a su permeabilidad (36), y favoreciendo el paso de sustancias más grandes entre las que destacan las células inmunitarias, como principales formadoras de placas desmielinizantes características de la EM (37).

1.5.2. Alteraciones mitocondriales

Las alteraciones mitocondriales, como ya se ha mencionado en el apartado anterior, son un mecanismo importante en el desarrollo de la EM. Las mitocondrias son los orgánulos responsables de obtener energía para la célula, mediante el ciclo de Krebs (38). Además de ser las encargadas de mantener con vida a las células, también poseen otras funciones como son el almacenamiento de Ca^{+2} , señalización celular y la apoptosis (37).

Al tener un mayor volumen de ERO se produce una reducción en la producción de energía. Cabe recordar que el cerebro tiene una elevada tasa metabólica, pues emplea gran cantidad de energía en la neurotransmisión (39). Cuando se tiene un axón desmielinizado, y por tanto falta de componentes en la membrana, se observa una célula con mayores requerimientos energéticos. Esto se debe a que los canales iónicos que favorecen la transmisión del impulso se ven aumentados en número. Al producirse estos cambios estructurales, las mitocondrias también se modifican a nivel estructural, localización, morfología e incluso en número. Como consecuencia



de la reducción en la producción energética, el gradiente iónico no puede restablecerse una vez se ha completado el impulso y se activa el canal de sodio/calcio, introduciendo Ca^{+2} en el citoplasma lo que da lugar a la cascada de muerte celular (37).

1.5.3. Inflamación. Interleuquina 6 (IL-6)

Tanto las alteraciones mitocondriales como el elevado estrés oxidativo, tienen una repercusión directa en el elevado estado de inflamación que presentan los pacientes con EM. El SNC es conocido como un órgano “inmunoprivilegiado”, que alberga numerosas poblaciones de células mieloides como los macrófagos o células residentes del SNC. Se conoce como neuroinflamación a una respuesta coordinada entre las células componentes del SNC, como por ejemplo la microglia y los astrocitos (40). En esta condición de neuroinflamación se produce una atracción de otro tipo celular, las conocidas células T. La presencia de estos linfocitos T y también de los B perivasculares, es más pronunciada en pacientes que han fallecido al inicio de la enfermedad, y sin embargo disminuye en pacientes con edad avanzada que presentan la enfermedad durante muchos años desde el diagnóstico (41-42).

La EM es impulsada por una disfunción del sistema periférico en la que los astrocitos y células del SNC, pueden sufrir una desregularización de su actividad contribuyendo a la progresión de la enfermedad (43). Diferentes estímulos de orígenes orgánicos (presencias de toxinas o infecciones) o estímulos externos (traumatismos) desencadenan una activación de las células anteriores, dando lugar a la neuroinflamación caracterizada por la liberación de mediadores inflamatorios y microgliosis. Una vez producida dicha acción se producen dos respuestas: una controlada donde el fin está establecido; y otra desregulada que conlleva a la neuroinflamación crónica del SNC (43-44), donde se produce una inducción de sustancias proinflamatorias que dan lugar a una exacerbación de la enfermedad (43,45). Por tanto, la cascada inflamatoria se caracteriza en gran medida por la liberación de mediadores inflamatorios donde se puede destacar a la familia de las citoquinas. Este tipo de moléculas tiene como principal característica la activación de genes diana que favorece el desarrollo de diversos procesos celulares. Entre todas estas destaca la interleuquina 6 (IL-6), que, además de propiedades proinflamatorias, es un importante regulador de respuestas inmune (46).



Analizando la estructura de estas moléculas, se pueden señalar dos subgrupos: uno donde presentan forma de una hélice alfa y otra con estructura retorcida. Esta diversidad estructural marcará a que tipo de receptor plasmático son capaces de activar, dando lugar por tanto a diferentes actividades para una única molécula (47). De acuerdo con lo anterior, varios estudios han señalado que los niveles IL-6 están elevados en los pacientes con EM (48-49). En la EM se produce una entrada de linfocitos y macrófagos que son los precursores de la síntesis de dicha citoquina (40,43). Esta síntesis podría estar involucrada con el aumento de la producción de anticuerpos y la diferenciación de células T, que podría a su vez condicionar un estado inflamatorio que promoviera la desmielinización en EM (40).

1.6. Signos y síntomas de la esclerosis múltiple (EM)

Como consecuencia del perfil inflamatorio de la enfermedad, las características clínicas de la EM dependerán en exclusiva de qué zona haya sido afectada, siendo la aparición de los síntomas gradual, evolucionando a lo largo de los días, remitiendo a las pocas semanas, y destacando como las más comunes (51):

- *Neuritis óptica*: se caracteriza por una pérdida de visión, o una alteración como puede ser dolor al movimiento de los ojos. Suele tratarse de un evento que tiene una duración de pocos días. Cuando la afectación se produce a nivel de la médula espinal, los síntomas que recoge el episodio pueden variar desde alteraciones en la percepción sensorial hasta afecciones del movimiento.
- *Discinesia paroxística*: se trata del segundo trastorno motor de la EM. Es considerada como espasmos con una duración menor a un minuto.
- *Signo de Lhermitte*: ocurre al realizar la flexión del cuello. Al producirse dicho movimiento se produce una sensación eléctrica que recorre todo el cuerpo, repentina e incómoda, que va desde el cuello hacia la columna vertebral cuando flexionas el cuello.
- *Incontinencia urinaria*: es debido a una disfunción del tracto urinario, basada en una dificultad para el almacenamiento de la orina, lo que favorece la hiperactividad del



músculo detrusor de la vejiga, dando lugar a la incontinencia que se acompaña de urgencia urinaria e incremento de la frecuencia miccional.

- *Diplopía*: es la percepción de 2 imágenes de un único objeto, y en estos pacientes dicha alteración se cree que viene dada por una lesión del nervio óptico.
- *Tos*: descartando problemas respiratorios, podría deberse a una alteración de origen neurológico, ya que el centro de la tos se encuentra ubicado a nivel medular.
- *Alteraciones emocionales*: los pacientes con EM se enfrentan a una gran incertidumbre debido a la variabilidad de la enfermedad. Es por esto que más de la mitad de los pacientes experimentan síntomas depresivos/ansiosos durante el transcurso de la patología. Se trata de síntomas que ocasionan unos cambios fisiológicos que desencadenan en un peor pronóstico para la enfermedad.
- *Síntomas cardíacos*: existe una cierta variedad de alteraciones de naturaleza cardíaca, asociadas a la enfermedad. Entre estas destaca los casos de fibrilación paroxística en el contexto de recaídas.

1.7. Alteraciones cardíacas en la fisiopatología de la enfermedad

La disfunción autonómica cardiovascular es común en la EM y contribuye significativamente a la discapacidad. En este sentido, se han evidenciado asociaciones entre un cambio de equilibrio cardiovascular simpático-parasimpático hacia una mayor modulación simpática y lesiones insulares e hipocampales izquierdas (52).

Las alteraciones cardíacas se podrían vincular a su vez a, por un lado, presencia de dislipemia, y por otro, aparición de cambios en la composición antropométrica, donde la pérdida muscular que caracteriza a la enfermedad se acompaña de aumento de masa grasa. Ambas variables, dislipemia y composición antropométrica, se relacionan con un estado inflamatorio que podría afectar a la actividad cardíaca.

1.7.1. Dislipemia y alteraciones cardíacas

La dislipemia es una alteración lipídica caracterizada por un incremento de los niveles de colesterol, triglicéridos (TG) o ambos, siendo uno de los principales factores de riesgo para sufrir un evento cardíaco. Esta alteración suele venir acompañada de un aumento del índice de masa



corporal (IMC) y consecuentemente de adipocitos (53). Los adipocitos poseen la capacidad de liberar citoquinas, lo que condiciona estar presente en un escenario inflamatorio (54-55). A su vez, la discapacidad, y el estado proinflamatorio característico de la EM mediado por la liberación desmesurada de citoquinas, puede provocar un aumento de estas lipoproteínas, de ahí la correlación de EM con dicha alteración (56), que a su vez podría explicar en parte por qué los pacientes con EM presentan un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, en cuanto a la dislipemia existe evidencia contradictoria sobre los niveles de lípidos o lipoproteínas en sangre que presentan los pacientes. Hay estudios que indican niveles de colesterol más elevados en EM en comparación con controles sanos. Y específicamente en España, se ha reportado dislipidemia en un 31% de pacientes con EM (57); pero también se ha publicado que hay menor frecuencia de hipercolesterolemia para estos enfermos, o nula alteración respecto a la población general (58). Sin embargo, y a pesar de la falta de consenso, cabe destacar la relevancia que tienen los niveles de ciertas lipoproteínas con la progresión de la patología; concretamente se ha visto asociación entre mayores grados de discapacidad (según la escala de estado de discapacidad expandida (EDSS)) y mayores niveles de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad (LDL) (59-60), siendo especialmente relevante en los pacientes con EMRR ya que impacta en la progresión de la enfermedad (61).

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Una elevada presencia de citoquinas en sangre puede influir en las lipoproteínas HDL, al provocar alteración en su tamaño, composición y función. Estas moléculas lipídicas son imprescindibles para el transporte del colesterol, además de presentar una función protectora frente a elevadas concentraciones de IL-6 (62). Relacionado con este aspecto, se ha observado cómo los pacientes con EM que más altos tienen sus niveles de HDL, son los que a su vez presentan menor volumen de la lesión realzada con contraste (60). Además de la relación de HDL en el campo inflamatorio, ésta también juega un importante papel en la enfermedad coronaria. La evidencia sitúa a dicha lipoproteína como un marcador relacionado con riesgo cardíaco; concretamente, niveles muy bajos de HDL se asocian con un incremento de sufrir una enfermedad cardíaca (63).



Lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Los pacientes con EM poseen partículas de LDL más pequeñas. Esto afecta a su funcionamiento, pues se ha descrito que el tamaño de la partícula juega un papel muy importante en el desempeño de sus funciones. Un tamaño reducido hace que la molécula sea más susceptible a la oxidación. Además, la disminución en el tamaño también se ha relacionado con una menor afinidad por el receptor de dicha partícula, el LDLr. Esta afinidad disminuida, hace que la partícula de LDL adquiera actividad proinflamatoria. En la misma línea, un elevado nivel de lipoproteínas circulantes por el plasma da lugar a la formación de depósitos en ciertas células, ocasionando un mal funcionamiento de las mismas y un aumento de la inflamación (64). Además, posiblemente relacionado con el incremento inflamatorio, el empeoramiento de la discapacidad en EM se asocia con niveles más altos de LDL (60).

A nivel cardiocirculatorio, las células endoteliales pueden verse dañadas por diversos factores, entre ellos, la inflamación y el estrés oxidativo que causa su disfunción (65). Esta disfunción permitiría la entrada precisamente de LDL, cargada de colesterol, a la pared íntima de la arteria. La entrada desmesurada de esta lipoproteína produce la activación de macrófagos cuya función es envolver dichas moléculas. En este proceso se dan una serie de acontecimientos de carácter proinflamatorio que derivarán en una liberación desmesurada de citoquinas, mayor acúmulo de LDL y aumento en la producción de ERO (66-67). Estos factores avivan la progresión de la placa aterosclerótica, hasta el punto de que puede desencadenar en su ruptura, dando lugar al evento cardíaco.

Triglicéridos (TG)

Otro de los lípidos importantes son los TG, cuyos niveles elevados, al igual que ocurre con LDL, se han vinculado significativamente con discapacidad funcional en EM (60).

Los TG también destacan como precursores de riesgo cardíaco (68). Los ácidos grasos juegan un importante papel en la generación de energía en el cuerpo; para ello, los TG representan la principal forma de almacenamiento y transporte de los ácidos grasos, desde la mucosa intestinal a los adipocitos y otras células. Este transporte, los TG lo consiguen mediante la actividad de los quilomicrones. Gracias a ellos, los ácidos grasos logran evitar la digestión hepática y pueden pasar directamente al torrente circulatorio a través de la linfa (69). Sin embargo, la



hipertrigliceridemia representa una de las principales alteraciones metabólicas clínicas, derivadas fundamentalmente de los malos hábitos de vida vinculados a la obesidad. Los estados de hipertrigliceridemia suelen asociarse a un ambiente de estrés oxidativo, dónde se induce a la liberación de citoquinas e interleuquinas, desarrollando un ambiente inflamatorio (68), que suele acompañarse de otros comportamientos como: la activación de la cascada de coagulación que da lugar a una mayor formación de coágulos, y la agregación plaquetaria (68,70-71). Estos eventos dan lugar a un aumento del riesgo cardíaco.

1.7.2. Cambios antropométricos y alteraciones cardíacas

Los parámetros antropométricos tienen un papel en el diagnóstico de ciertas enfermedades que contribuyen a los eventos cardíacos. Estas enfermedades, responsables de aumentar el riesgo cardiovascular, pueden estimarse y secuenciar utilizando diferentes parámetros antropométricos, los cuales pueden utilizarse como predictores de futuros eventos cardíacos. Es por ello que una modificación de los mismos, podría conducir a reducir las alteraciones cardíacas (72-73).

En cuanto a la EM, a pesar de que es una enfermedad del SN caracterizada por un proceso de desmielinización mediada por la fuerte respuesta inmunológica, el desarrollo de la patología se caracteriza por cambios también a nivel periférico, entre los que destacan los del sistema musculoesquelético y el tejido graso.

• Tejido muscular

Los cambios que presentan los pacientes con EM en su sistema locomotor, se basan fundamentalmente en la pérdida de tejido muscular que implica una disminución progresiva de la fuerza muscular máxima (74-78). Esta debilidad ha sido asociada, no solo a la disminución de masa magra, sino también a cambios fisiológicos en la estructura muscular de los pacientes con EM, pudiéndose observar una pérdida en el tamaño de las fibras musculares (72). Relacionados con la pérdida muscular, se ha descrito la importancia de ciertos biomarcadores, que pueden ayudar a valorar el estado en la progresión de la patología, o la respuesta a intervenciones terapéuticas que tengan como objetivo la mejora en la actividad muscular y por tanto funcional.

Haptoglobina (Hp)

La haptoglobina (Hp) es una proteína de origen mayoritariamente hepático (otros tejidos también poseen la capacidad de sintetizarla), que tiene como principal función viajar por el torrente sanguíneo con la finalidad de unirse a la hemoglobina (Hb) libre para entregarla en el hígado y proceder a su eliminación (79). Sin embargo, y como se muestra en la Figura 1, los niveles de Hb se ven aumentados en condiciones prooxidantes (debido a una correlación directa con el incremento de la citoquina IL-6) o por un daño musculoesquelético (80-81).

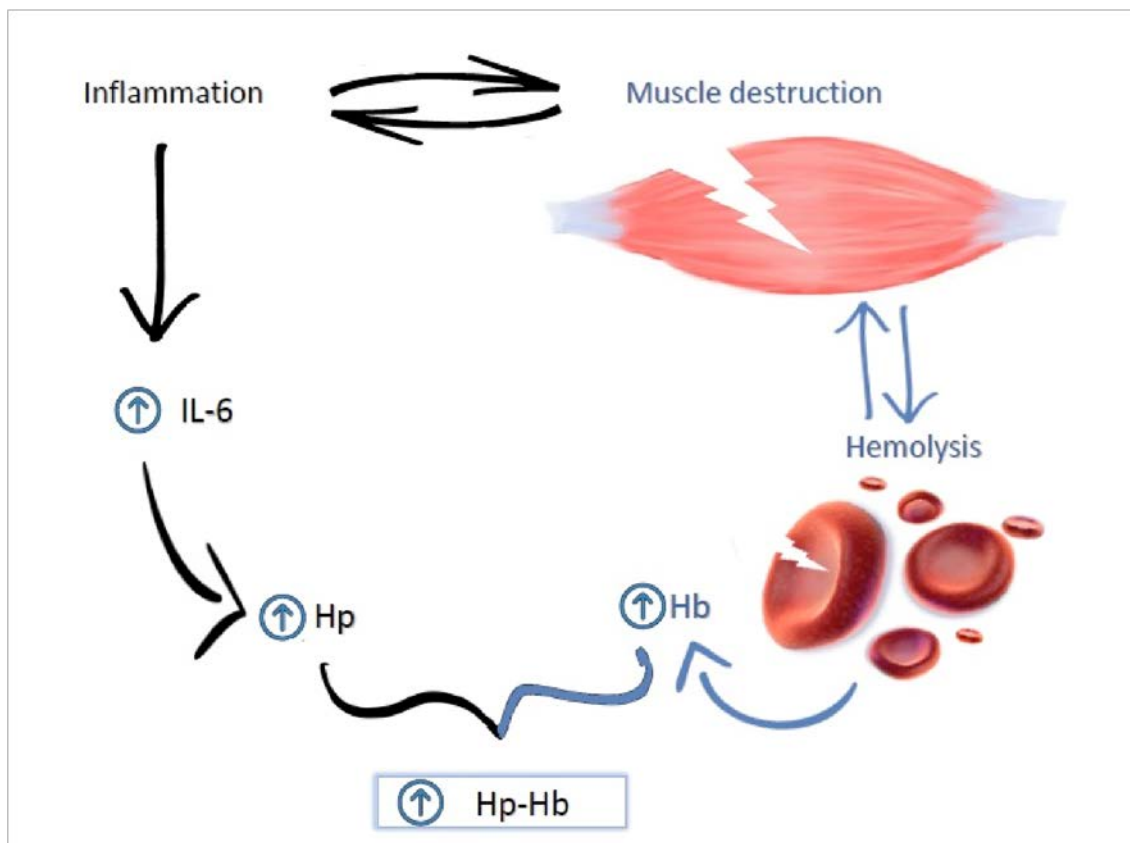


Figura 1. Curso de la Esclerosis Múltiple (EM) con altos niveles de inflamación caracterizados por un aumento de interleuquina 6 (IL-6) de los que, a su vez, depende la expresión de Haptoglobina (Hp). Además de estar relacionada con la inflamación, esta enfermedad cursa con destrucción muscular, lo que a su vez se relaciona con la hemólisis; y esta hemólisis aumenta la destrucción muscular como consecuencia de la actividad pro-oxidativa de la Hemoglobina (Hb). Sin embargo, por otro lado, el aumento de Hp plasmática promueve su unión a Hemoglobina libre (Hp-Hb), disminuyendo sus niveles en sangre y limitando así su acción pro-oxidativa. Fuente: elaboración propia.



Por tanto, y a pesar de que se produce un aumento de Hp como consecuencia del incremento de IL-6, su actividad periférica contribuye a la reducción del daño oxidativo en el músculo al neutralizar a la Hb libre. Al captar la Hb libre que se expulsa al espacio extravascular tras el daño muscular, se reduce la deficiencia de O₂ en el músculo pues dicha Hb captada ya no forma la relación de Hb-O₂. Esta función es lo que caracteriza a la Hp como una molécula antioxidante (82-84).

Además, no solo presenta actividad periférica; a nivel central también juega un importante papel defendiendo a la mielina de la acción provocada por la Hb libre. Esta última, se encuentra presente en el SNC, resultante de la destrucción de eritrocitos dada la fragilidad de los mismos en dicha enfermedad (86).

Sin embargo, cuando las reacciones de unión se producen en zonas de hemorragia, como puede ocurrir en las zonas donde hay presente una placa aterosclerótica, la única forma que posee el organismo para eliminar el complejo Hp-Hb es mediante la acción específica de macrófagos, esencialmente los CD163. Este tipo de macrófagos tienen la capacidad de liberar sustancias pro inflamatorias, entre ellas citoquinas tipo IL-6 (87). Dicho ambiente inflamatorio actúa como un círculo vicioso, dando lugar a una descompensación de la placa, que a menudo desencadena en su ruptura y por consiguiente conducen a un evento cardíaco (88).

Proteína C reactiva (PCR)

La proteína C reactiva (PCR) es un biomarcador de fase aguda, secretado por los hepatocitos, en respuesta a citoquinas durante inflamación, daño tisular e infección. (89). Es por esto que niveles más altos de PCR se correlacionan normalmente con daño muscular. El daño puede darse por distintos motivos; el primero de ellos es que la PCR posee la capacidad de activar la cadena de apoptosis de las células musculares del tejido coronario, mediante la inducción de un gen. Por otro lado, la PCR posee la capacidad de atraer monocitos hacia el músculo lo que promueve la actividad proinflamatoria (90).

También está directamente vinculada con alteraciones cardiocirculatorias. Durante la formación de placas ateroscleróticas la respuesta inflamatoria puede conllevar a elevar los niveles de esta molécula. Y es que, entre los numerosos biomarcadores de daño cardíaco, la PCR destaca en el diagnóstico de los eventos cardíacos; especialmente porque puede verse alterada en etapas muy



tempranas, y sus niveles se mantienen estables durante todo el proceso patológico, siendo además fácil de cuantificar (89).

A parte de su capacidad diagnóstica en los eventos cardiacos, la evidencia también apunta a que la PCR puede inducir, por sí misma, un evento cardiaco. Esto se debe a su capacidad de activación sobre la cascada de coagulación, mediante macrófagos secretores de factor tisular (91-92).

• Tejido adiposo

Cabe destacar que, no solo se ha evidenciado una pérdida de masa magra en EM, sino que acompañando a la alteración progresiva del tejido muscular también se observan cambios en los porcentajes de masa grasa, caracterizados por un incremento progresivo de los mismos (81,93). Se reconoce a la célula adiposa como una célula en anillo compuesta por una fina capa de citoplasma que envuelve una gota de grasa. Sin embargo, este tejido es endocrino, inflamatorio y metabólicamente complejo. Estas cualidades vienen determinadas por la función reguladora en el metabolismo de la grasa, además de estar comunicado con el SNC y desempeñar un papel importante en la respuesta inflamatoria (93-94).

La ubicación de la grasa corporal tiene mayores implicaciones para los riesgos asociados a la salud. Estudios recientes han conseguido demostrar que los números de macrófagos se encuentran aumentados en las personas con obesidad frente a los individuos no obesos. Este hallazgo, da sentido a que el tejido adiposo juegue un papel importante en la inflamación, teniendo ésta un origen en el síndrome metabólico. Esto hace que todos los estímulos de sobrealimentación, inactividad y envejecimiento den como resultado una activación del tejido adiposo, que desencadena una hipersecreción de adipocinas pertenecientes a la familia de las citoquinas (93). Por consiguiente, muchos estudios (95-100) han podido determinar que, en estos individuos con mayor porcentaje de grasa, se encuentra una mayor expresión de proteínas proinflamatorias como son la IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF- α) y PCR entre otras. Estas moléculas tienen un papel directo en el metabolismo disminuyendo la sensibilidad a la insulina, lo que limita así sus actividades antiinflamatorias, produciéndose a su vez una retroalimentación positiva en la cual se incrementa la secreción de moléculas inflamatorias (93,95,101-103).



A nivel clínico, los pacientes con EM tienen una serie de disfuncionalidades relacionadas con la pérdida de masa muscular acompañada de aumento de la masa grasa (104,74). Entre estas alteraciones destaca precisamente el incremento del riesgo cardiovascular (105); lo que puede deberse, a que el cambio antropométrico indicado representa un aumento de los niveles lipídicos, que conduce a síndromes cardiometabólicos (106). Desde el mismo enfoque clínico, una acumulación de grasa abdominal es importante, ya que tiene una marcada relación con el estado inflamatorio de la enfermedad, (93) mediando en la producción de citoquinas proinflamatorias. Entre estas citoquinas, guarda especial relación con la EM, la IL-6 (48). Ambas variables, obesidad e IL-6, se encuentran correlacionadas positivamente, en especial con un aumento de la grasa abdominal (107).

Paraoxonasa 1 (PON1)

Las paraoxonasas (PONs) son una familia de enzimas antioxidantes con propiedades antiinflamatorias, compuesta por tres miembros: PON1, PON2 y PON3 (108). La PON1 es una glucoproteína sintetizada en el hígado principalmente, a partir de la ingesta de dietas ricas en grasa, como es la dieta mediterránea que ha demostrado un incremento de la síntesis de PON1 (109). Su principal función es hidrolizar los ácidos grasos oxidados y proteger de la oxidación a las lipoproteínas, y especialmente la LDL (110-111). Como consecuencia, varios ensayos han demostrado que se trata de una molécula con un alto poder antioxidante. Esto es debido a que entre sus principales funciones se debe destacar: la eliminación de peróxidos, la protección de los macrófagos frente a la oxidación y la eliminación de compuestos organofosforados. Por tanto, se puede señalar que se trata de una molécula que forma parte de la inmunidad innata del organismo (111-112).

Pero quizás la principal actividad antioxidante recae en la capacidad que posee para producir compuestos inocuos para el entorno de células del SNC. Cuando los leucocitos producen ERO o las membranas celulares producen fosfolípidos oxidados, es la PON1 la encargada de transformar dichas especies tóxicas, actuando como agente neuroprotector (111).

Cuando aparecen estas sustancias tóxicas, determinadas por un proceso inflamatorio crónico, se genera un escenario tan anómalo que podría dañar los procesos enzimáticos desarrollados por PON1. Dentro de estos productos tóxicos, como es el caso de la Apolipoproteína A-1 (APOA1),



la PON1 podría ver modificada sus funciones biológicas, y además se verían afectados sus niveles (34).

En cuanto a su influencia en la actividad cardíaca, a nivel bioquímico el riesgo cardíaco se correlaciona con niveles bajos de la molécula PON1 (113). Es más, estos niveles disminuidos incluso se han relacionado con un posible rol importante en la patogénesis de la enfermedad cardíaca, dada la asociación que establece con las lipoproteínas y el metabolismo del colesterol (114).

Butirilcolinesterasa (BuChE)

La acetilcolina (Ach) es conocida por tratarse de uno de los principales neurotransmisores del SNC y del sistema nervioso periférico (SNP). Los neurotransmisores, especialmente los colinérgicos, participan en el ajuste de la respuesta inmune durante la inflamación. Ensayos recientes han podido demostrar que la Ach es capaz de modular reacciones del sistema inmunitario. Esto es debido a que puede inhibir la liberación de mediadores proinflamatorios de las células inmunes (115-119). La Ach es eliminada, para mantener la homeostasis, por la enzima butirilcolinesterasa (BuChE). Dicha enzima está implicada en la EM durante los procesos de desmielinización y en la neuroinflamación. En este sentido, y como se muestra en la Figura 2, un aumento de la actividad de BuChE da como resultado niveles más bajos de Ach y por lo tanto una ausencia de respuestas antiinflamatorias, favoreciendo así las respuestas inmunitarias proinflamatorias (120).

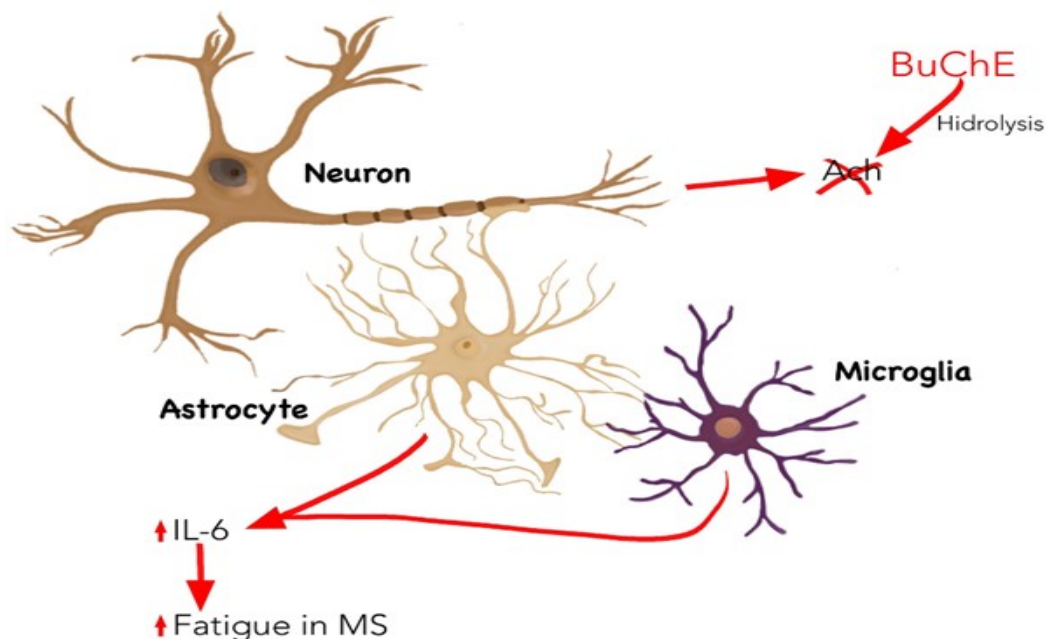


Figura 2. Mecanismo inflamatorio ligado a la esclerosis múltiple (EM) en el que interviene butirilcolinesterasa (BuChE), que se expresa principalmente por neuronas y acetilcolina (ACh) hidrolizada. Un aumento en la actividad de BuChE en particular aumenta la producción de interleuquina 6 (IL-6) al disminuir los niveles de ACh, lo que se asocia con la aparición de fatiga, que es característica de la enfermedad. Fuente: elaboración propia

Por tanto, la BuChE parece estar relacionada con la actividad inmunológica, y su producción podría estar asociada con los niveles de marcadores específicos del proceso de activación del sistema inmunológico, entre los que se encuentra la IL-6 (121).

La evidencia ha señalado que los niveles de ACh son más bajos en pacientes con EM que en los sujetos sanos (122-123), al igual que se observan niveles más altos de BuChE en los pacientes enfermos (124). Esto conduce también a un aumento de IL-6 en sangre debido a la falta de control de la retroalimentación negativa de la ACh (125). Así pues, un incremento de BuChE podría jugar un papel importante como marcador de la inflamación producida en la enfermedad y relacionada con la progresión. En este sentido, los estudios de la enfermedad con modelos animales (como en la encefalomiелitis autoinmune experimental) han reportado una mayor inflamación y desarrollo de la enfermedad en relación con una expresión más alta de BuChE en el SNC (126).

Sin embargo, la función fisiológica de la colinesterasa plasmática a nivel periférico no es bien conocida. Por un lado, la expresión más alta de la enzima en el SNC en modelos animales podría



correlacionarse con los niveles de BuChE en la sangre, porque los niveles en este tipo de muestra están fuertemente correlacionados con la actividad de la enzima de síntesis de Ach, la colina acetiltransferasa; por lo tanto, la desregulación debido a un aumento en BuChE podría indicar un nivel de inflamación a nivel central (127); pero, por otro lado, BuChE ha estado relacionada con el metabolismo de los lípidos y por lo tanto, esta actividad está vinculada a niveles de lipoproteínas en plasma (128-129). Es por esta razón que BuChE podría representar diferentes roles, uno de los cuales es la señalización colinérgica en los estados de inflamación en la EM, y la otra es la metabolización de las grasas vinculadas a la inflamación en patologías como el síndrome metabólico (130).

Albúmina

El plasma está formado por varios compuestos, como las proteínas entre las que destaca la albúmina como la mayoritaria, con un porcentaje de hasta el 50%. Presenta una vida media de 15-20 días y diversas funciones, como, por ejemplo: transporte de ciertas moléculas o fármacos, capacidad antioxidante y unión a metales (131-133). Durante la rotura de la integridad de la BHE se produce el paso de diversas moléculas plasmáticas, entre las que se encuentra la albúmina (134). Dicho paso podría resultar beneficioso, pues la albúmina, como se ha indicado anteriormente, tiene la capacidad de unirse con los metales y al grupo hemo, que son capaces de promover la síntesis de radicales libres; por lo que al ser captados por la albúmina se disminuirá la concentración de ERO (132-133,135). En este mismo sentido y como se recoge en la Figura 3, varios ensayos han determinado elevados niveles de metales pesados, en los vasos dañados cercanos a las BHE, zona en la que también se ha detectado gran cantidad de albúmina (136-138). Además de esta actividad, los niveles de albúmina pueden verse afectados por procesos inflamatorios progresivos, en los que se verían disminuidos de una manera inversamente proporcional a los de IL-6 que por tanto aumentarían (139).

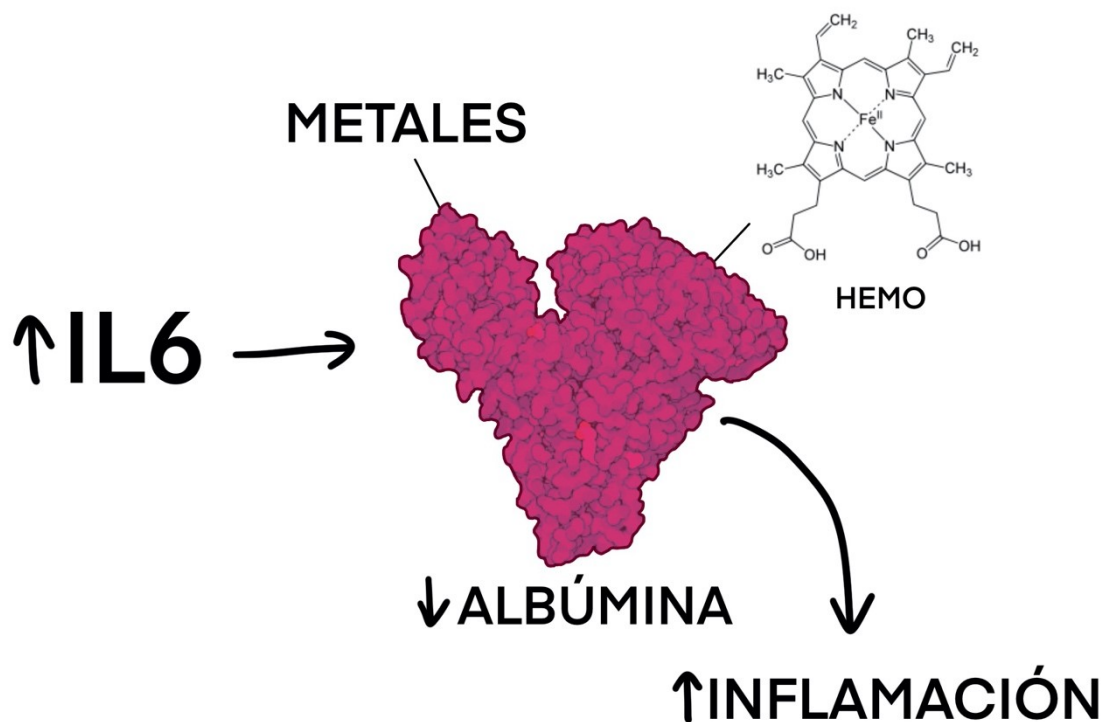


Figura 3. Interacción de la interleuquina 6 (IL-6) con la albúmina. La albúmina tiene como principal función la captación del grupo hemo y de metales para su posterior eliminación y disminución de la inflamación. La EM se caracteriza por ser una patología con niveles altos de IL-6. Existe una correlación entre ambas moléculas, donde vemos que niveles altos de IL-6 ocasionan que los niveles de albúmina disminuyan. Fuente: elaboración propia

Todas estas evidencias señalan a la albúmina como una molécula antioxidante y neuroprotectora; aspecto al que habría que añadir su actividad antiinflamatoria y antiagregante plaquetaria (138,140-141), lo que la convierte en un buen marcador de alteraciones cardiovasculares que cursan con una disfunción endotelial, donde precisamente se ve incrementado el estado inflamatorio y el estrés oxidativo (142). Por tanto, unos valores bajos de dicha molécula en suero (hipoalbuminemia), se relacionan con diferentes alteraciones cardíacas como pueden ser: las que se manifiestan en enfermedades de grandes vasos, insuficiencia en la bomba cardíaca, alteraciones en la conducción eléctrica del corazón o eventos tromboembólicos; pudiendo ser un factor de riesgo de enfermedad cardíaca (143).



Además de las funciones descritas anteriormente, la albúmina es la encargada del transporte de sustancias, destacando principalmente el de compuestos endógenos/exógenos como puede ser el cortisol (144).

Cortisol

El cortisol es una molécula de naturaleza lipídica sintetizada por el eje Hipotalámico-PituitarioAdrenal (HPA). El eje HPA depende del nivel de estrés emocional percibido por el individuo, siendo éste el estímulo que lo inicia. Debido a esta relación, una persona sometida a un estrés crónico, evidenciará una estimulación sostenida de dicho eje produciéndose una liberación desproporcionada de hormonas glucocorticoides (GCs). Los estímulos estresantes activan el eje HPA, produciéndose inicialmente la secreción de hormonas liberadoras de corticotropina o corticoliberina (CRH) en el hipotálamo, que estimula a su vez la producción de corticotropina (ACTH) en la hipófisis, y que finalmente actúa a su vez sobre el córtex adrenal (concretamente la zona fascicular) responsable de la síntesis de hormonas glucocorticoides (145).

Dentro de todos los GCs destaca la síntesis de cortisol (146-147). El cortisol sigue un patrón diario de secreción (circadiano), de modo que los niveles aumentan rápidamente después de despertar y disminuyen lentamente a lo largo del día (148).

Sin embargo, la producción y liberación desmesurada de cortisol viene dada por la hiperestimulación del hipotálamo cuando este se encuentra en presencia de citoquinas inflamatorias, como es el caso de la IL-6 y TNF- α (149). Cabe destacar que la hormona CRH puede ser producida en otros tipos celulares, como las células inmunes. Esto plantea dos tipos de hormona y por tanto dos funciones distintas. Por un lado, se encuentra la CRH de origen central que aporta protección; y por otro la CRH de origen local que agrava la inflamación (149). En la mayoría de estudios, se evidencia que los pacientes con EM poseen unos niveles de cortisol elevados respecto a las personas sanas (150-152). Esto podría ser consecuencia de los altos niveles de depresión que presenta la enfermedad (153), lo que además desempeña un papel notablemente relevante en la progresión de la patología (154). Sin embargo, en la EM, el papel de cortisol en la presencia de depresión y progresión de la enfermedad no está claro, ya que, por un lado, la hiperactividad de HPA en algunos pacientes se ha asociado con una progresión más

lenta de la enfermedad, dado la actividad inmunomoduladora de los glucocorticoides (155); mientras que, por otro lado, el exceso de cortisol también conduce a daños progresivos en la actividad mitocondrial, causando niveles aún más altos de estrés oxidativo (156-157). Esta es la razón por la cual la relación de cortisol con la presencia de depresión en pacientes con EM podría deberse a otros mecanismos. Entre estos, se debe tener en cuenta la presencia de masa grasa y concretamente a nivel abdominal, ya que los niveles crónicamente altos de cortisol se han asociado con la depresión a través de la presencia de grasa abdominal (158) presente en la mayoría de estos pacientes (159), lo que está vinculado a un peor pronóstico (160). Específicamente, es el cortisol activo en forma libre que pasa por la membrana celular, el que se correlaciona positivamente con el porcentaje de grasa (161), y principalmente de la región abdominal debido a una expresión más alta de 11 β -hidroesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β HSD1) en esta región (162). Dado que es una molécula de naturaleza soluble en grasa, los niveles de cortisol libre (aproximadamente 6%) (163) dependen de globulina (GBP, proteína de unión a la globulina) que la lleva principalmente (164), así como de la albúmina que la transporta en un 14% (165). Es por esto que los tratamientos que alteran los niveles de albúmina en sangre pueden variar los niveles de cortisol activos. Todos estos procesos se recogen en la Figura 4.

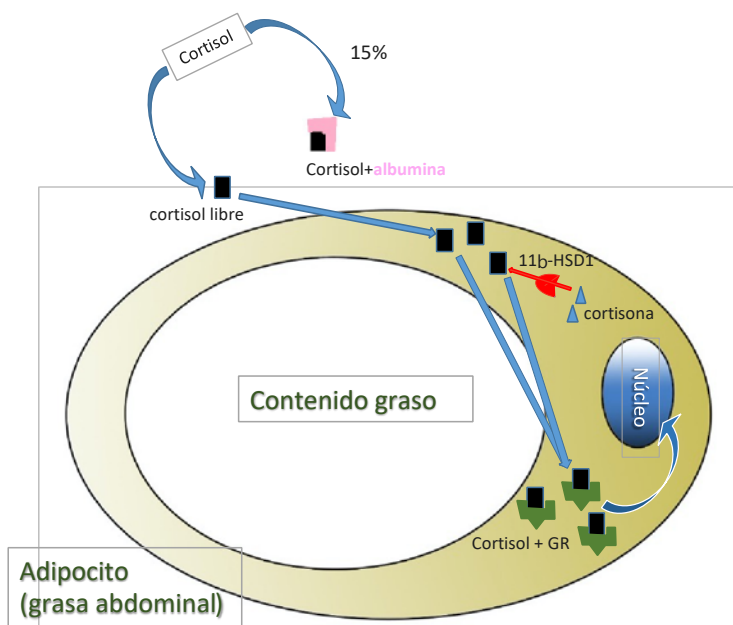


Figura 4. Acción del cortisol en el adipocito. El cortisol es una molécula de naturaleza lipídica; esto hace que su transporte en sangre requiera de proteínas transportadoras. El 14% del cortisol total es transportado por la proteína albúmina, habiendo un 6% de cortisol en sangre que está en forma libre. La cantidad de cortisol libre, se correlaciona positivamente con la masa grasa corporal, principalmente de la región abdominal como consecuencia de una mayor expresión de 11 β -hidroesteroide



deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1) que transforma cortisona en cortisol. Las moléculas de cortisol (y no de cortisona) se unen a su vez a su receptor, que una vez activado se transloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción

Fuente: elaboración propia

1.8. Tratamientos farmacológicos de la Esclerosis Múltiple (EM)

La EM carece de un tratamiento farmacológico que cure la enfermedad; sin embargo, existe un conjunto de fármacos, alguno de ellos con diferentes métodos de acción, que se emplean para tratar de moderar el curso de la patología. Estos fármacos suelen ser empleados con el fin de reducir nuevos daños en la sustancia blanca o bien evitar las recaídas y el aumento de la discapacidad (166). Dentro de los fármacos más empleados para el tratamiento de la enfermedad se encuentran aquellos que forman parte de las terapias modificadoras de la enfermedad (TME) (167). Entre estos se encuentran:

- *Fármacos intramusculares:* están destinados a reducir la frecuencia y gravedad de las recaídas, así como a disminuir las lesiones. Dentro de estos fármacos se localiza el interferón beta-1^a, el acetato de glatiramer, y peginterferón beta-1^a (167-169).
- *Fármacos orales:* pese a que se desconoce exactamente el mecanismo de acción de la EM, se administra este grupo de fármacos (dimetilfumarato, fingolimod y teriflunomida) para reducir la respuesta celular al estrés oxidativo y el nivel de linfocitos libres en el torrente sanguíneo (167). Además, como principal efecto adverso en relación a la alteración cardíaca descrita anteriormente, estos fármacos suelen ocasionar eventos como la bradicardia, arritmias o bloqueos cardíacos (167).
- *Fármacos intravenosos:* su uso consiste en la infusión de anticuerpos monoclonales destinados a la lisis de células T, células B y compuestos de la serie blanca; se considera la terapia más efectiva contra la EM (167-168).

Sin embargo, a pesar de todos estos tratamientos, a día de hoy no existe un tratamiento curativo de la enfermedad. Por lo tanto, es necesario plantear nuevas alternativas terapéuticas en base a los mecanismos patogénicos previamente descritos.

1.9. Tratamientos no farmacológicos para la Esclerosis Múltiple (EM)



La EM se considera una enfermedad compleja e impredecible que posee un curso fluctuante; es por ello que su tratamiento requiere de un enfoque multidisciplinario en cuanto a su atención. Sin embargo, en los últimos tiempos se contempla como objetivo fundamental tratar de mejorar el elevado estado inflamatorio que es común a lo largo de toda la progresión de la enfermedad, tratando de frenar el estrés oxidativo y de mejorar el estado energético mitocondrial de las neuronas.

1.9.1. Polifenoles. Epigallocatequina galato (EGCG)

Una de las alternativas que podrían ser más eficaces para frenar el estado de estrés oxidativo, es la administración de antioxidantes. Entre estos posiblemente destaca especialmente la eficacia de los polifenoles. Los polifenoles son un grupo de fitoquímicos derivados de las plantas, que contienen varios antioxidantes hidrosolubles, altamente beneficiosos para la salud. Dada su abundancia en la dieta, los polifenoles se han establecido como adyuvantes habituales en el tratamiento de ciertas patologías (170). En este sentido, cabe destacar que actúan como hepatoprotectores ante un aumento en la oxidación de los ácidos grasos, modulando el estrés oxidativo y la inflamación (170). Comúnmente estos compuestos se clasifican atendiendo a su estructura química que suele estar formada por una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Por tanto, existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos (171-174):

- **No Flavonoides**

Ácidos fenólicos: son unos compuestos polifenólicos derivados del ácido cinámico. Suelen estar presente en frutas, verduras, en el grano y en la cáscara. Para ser liberados en el organismo deben sufrir una hidrólisis mediante enzimas. El más conocido es el ácido gálico.

Curcuminoides: es el responsable de dar color amarillento a ciertos alimentos. Como principal polifenol en este subgrupo se encuentra la curcumina.

Estilbenos: dentro de este subgrupo el resveratrol es el más habitual; puede obtenerse de alimentos y bebidas derivadas de la uva.



- **Flavonoides**

Isoflavonas: se caracterizan por tener un anillo B unido al anillo C3. Suelen estar presentes en las legumbres; es por ello que están muy presentes en las dietas de algunos países.

Flavonoles: considerado el subgrupo más abundante en todo el reino vegetal. La quercetina es el flavonol más representativo del grupo. Este grupo suele estar presente en té y el vino.

Flavonas: al contrario de los flavonoles, este polifenol no se encuentra tan extendido. Se ha determinado en algunos cítricos y en el perejil, siendo los únicos alimentos comestibles ricos en flavonas.

Flavanonas: están muy presentes en los cítricos y tomates, pese a que también pueden encontrarse en plantas aromáticas.

Antocianidias: suelen encontrarse en ciertos cereales, vino tinto y algunos vegetales o frutas, por lo que están ampliamente distribuidas en la dieta humana. Es considerado uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales.

Flavonoles: como principal fuente de este grupo encontramos el chocolate, el vino y el té.

Esta clasificación se recoge en la siguiente figura (Figura 5)

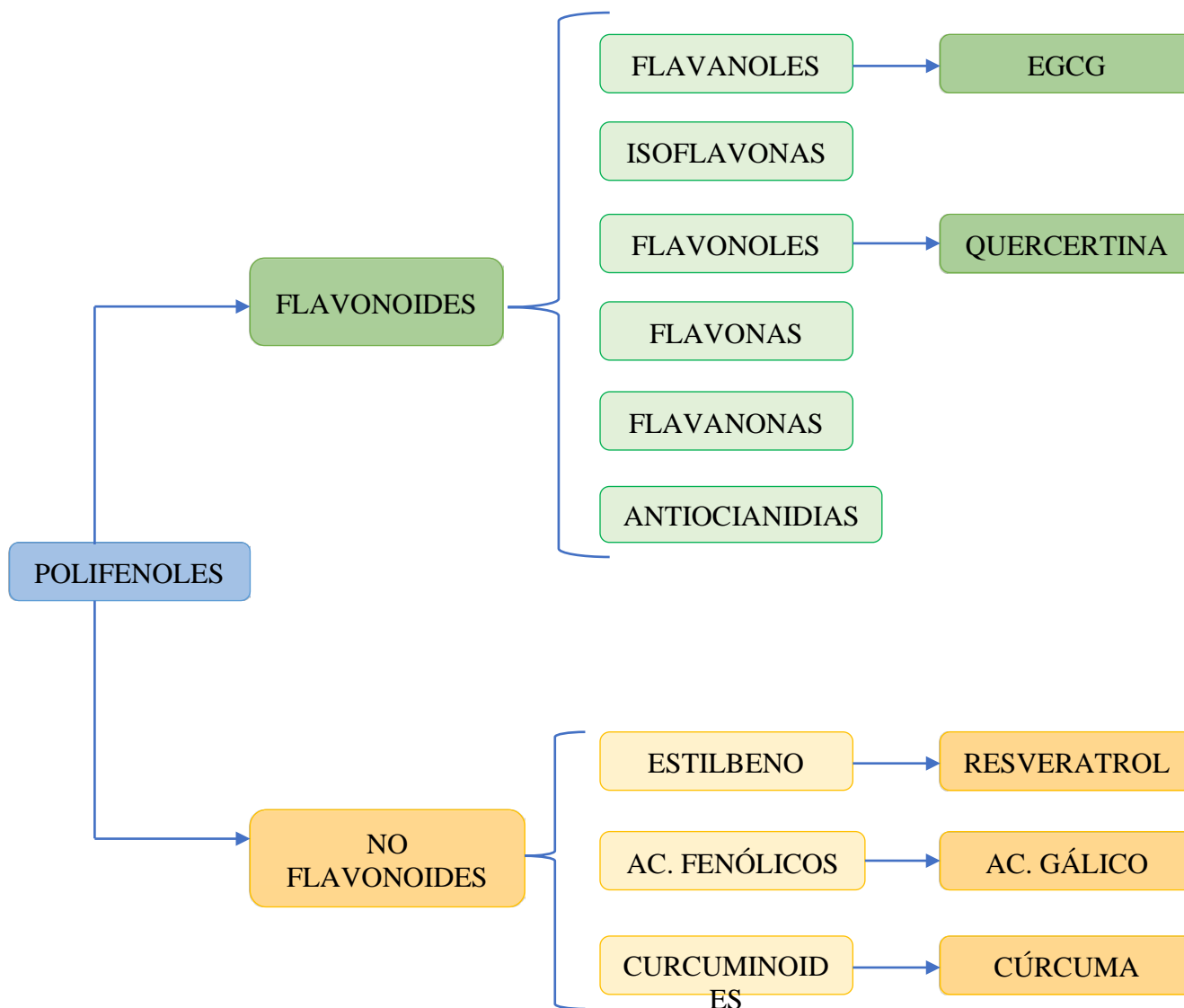


Figura 5. Clasificación de los polifenoles. Fuente: Elaboración propia

Como se muestra en la figura anterior, dentro de los flavonoles se encuentra la EGCG, principal catequina del té verde. Es abundante la literatura que correlaciona el consumo de té verde con la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades nerviosas (175-177), y dicha capacidad recae principalmente en la actividad de la EGCG (178-179). La EGCG (Figura 6) se muestra como una de las más eficaces frente al tratamiento de diversas enfermedades que cursan con neurodegeneración.

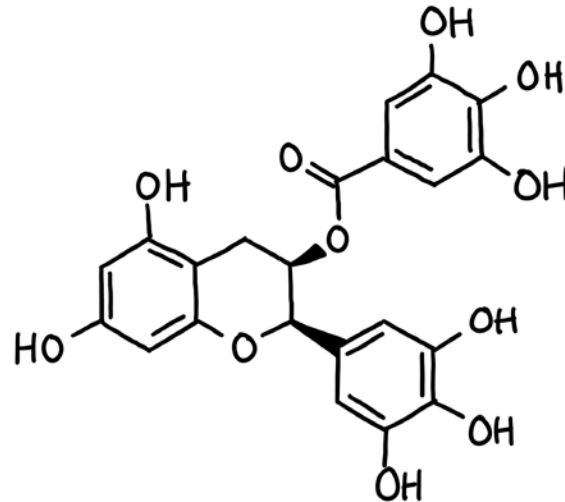


Figura 6. Estructura química de la Epigallocatequina-3- galato (EGCG). Fuente: elaboración propia.

Se trata de una catequina con un gran poder antioxidante que se debe a su eficaz capacidad para inhibir la formación de fibrillas del péptido AB (principal precursor de ciertas enfermedades neuronales) (179). Este péptido es formado a través de una reacción mediada por la proteína precursora de amiloide (PPA). La EGCG tiene la capacidad de interferir en la reacción celular inhibiendo la síntesis de dicho péptido. Como consecuencia, también es capaz de reducir el estrés oxidativo generado a nivel neuronal, de ahí su eficacia frente a enfermedades de naturaleza neurodegenerativa.

En cuanto a EM, se ha visto como muestra gran capacidad a la hora de disminuir la gravedad de la enfermedad en modelos animales, pues reduce la inflamación cerebral y la desmielinización (180) junto con una menor expresión de la citoquinas y quimiocinas inflamatorias (181). Esto en parte podría deberse a su capacidad para atravesar la BHE y acumularse dentro de las mitocondrias protegiéndolas del estrés oxidativo (182). Del mismo modo, otra característica beneficiosa para la EM es el bloqueo en la producción de ERO, atenuando además la oxidación lipídica. Dicho bloqueo vendría determinado a dosis altas por la degradación de la disfunción mitocondrial, lo que se traduce en una disminución de muerte neuronal (178-179).

Otra característica de este compuesto es su capacidad para quelar iones metales agregados. Haciendo de nuevo hincapié en su estructura, los grupos hidroxilo ayudan a transformar dichos



agregados en compuestos hidrófobos. Además, le permiten a la EGCG unirse a proteínas que ya han sufrido una mutación, y devolverlas a su estructura secundaria, recuperando así la estabilidad (176). A modo de resumen, este compuesto, debido a su estructura química, posee la capacidad de intervenir en diferentes vías productoras de compuestos intermedios o bien unirse a compuestos ya formados, transformándolos en formas no tóxicas para el medio neuronal e interviniendo así en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas. Además, cabe destacar cómo su administración mejora las aptitudes cognitivas, lo que confirma que EGCG puede atravesar la BHE con eficacia. Finalmente, las mediciones séricas no corresponden con la ingesta oral; esto es debido a que la absorción del compuesto se produce en intestino delgado, una vez ha sido expuesta a la acción de ciertos ácidos (171).

En cuanto a sus posibles efectos adversos, siendo un complemento nutricional son escasos los eventos negativos descritos que se le han atribuido. Únicamente se han documentado dos casos de reacción hepática grave (en sujetos con dosis muy elevadas), y el resto han sido procesos digestivos típicos, entre los que destacan gases o alteraciones en la motilidad (183-184).

Epigallocatequina galato (EGCG) y mejoras antropométricas

Existe una relación directa de la presencia de obesidad con un incremento en el estado de inflamación (185-187). En este sentido, en un escenario marcado por la obesidad se encuentra a individuos con un alto estrés oxidativo dada la presencia de ERO (185). En todo este paradigma, la literatura ha evidenciado el uso del té verde, en especial el de su principal polifenol EGCG, como un agente anti-obesogénico. Esta capacidad le viene atribuida por su eficacia en la reducción de la absorción de grasas, e inducción a la modificación del apetito (188-189). Además de estas cualidades, la EGCG resulta interesante en el tratamiento de la obesidad y su marco inflamatorio por su eficacia a la hora de eliminar ERO y radicales nítricos producidos durante el sobrepeso (190).

Asimismo, la EGCG también ha demostrado una reducción de los niveles de hierro (Fe) sérico, muy elevados en la obesidad (191). También, entre los minerales, la EGCG puede modificar los niveles de magnesio (Mg) aumentando su concentración; la evidencia ha demostrado que el Mg tiene una relación directa con la glucosa, dónde un aumento del mineral produce una estabilización del páncreas y por tanto una normalización de los niveles de glicemia (192).



Finalmente, también cabe destacar cómo la EGCG presente propiedades beneficiosas a la hora de producir cambios fisiológicos relacionados con el metabolismo lipídico (193).

Epigallocatequina galato (EGCG) y mejoras en el riesgo cardíaco

En cuanto a la actividad cardioprotectora se ha establecido que dicho polifenol mejora muchos de los marcadores descritos en el riesgo cardiovascular. Así pues, la EGCG reduce los lípidos libres en el torrente circulatorio, contribuye a mejorar las lesiones por isquemia, reduce el estrés oxidativo, y además atenúa la inflamación protegiendo la función del tejido miocárdico (194). También, se ha podido observar en hombres obesos después de recibir 800 mg de EGCG a diario una disminución de la presión arterial diastólica lo que reduce el riesgo cardíaco (195), así como una disminución significativa en LDL en mujeres posmenopáusicas después de administrarles 800 mg también a diario (196).

1.9.2. Triglicéridos de cadena media (TGCM). Aceite de coco

La dieta juega un papel muy importante en la prevención de numerosas enfermedades. Dentro de los lípidos, un grupo destacado, son los triglicéridos de cadena media (TGCM), que están compuestos de ácidos grasos saturados (AGS). Estos tienen en su estructura un número de átomos de carbono que varía entre 6 y 12. Dentro de los AGs, destacan los ácidos: caproico con 6 carbonos, caprílico con 8 carbonos, cáprico con 10 carbonos y finalmente el laúrico que posee 12 átomos de carbono en su estructura. Estos TG se diferencian de los de cadena larga, así como de los de cadena corta, en los procesos de digestión y absorción que sufren. En este sentido, la hidrólisis que se da en los de cadena larga es mucho más lenta que la hidrólisis de los TGCM. Asimismo, la principal diferencia entre ambos TG es la velocidad y eficacia de absorción. Otra de las peculiaridades de los AGCM es que estimulan menos que los AGCL la secreción hormonal de colecistoquinina (esta tiene un papel fundamental en la digestión, pues ayuda a contraer la vesícula biliar para que se excrete la bilis, llegando finalmente al intestino delgado), de los fosfolípidos biliares y también de colesterol.

Esto hace que en situaciones en las que hay deficiencia de sales biliares, los AGCM se absorban igualmente, al no necesitar a estas sales en la misma medida, para emulsionarse; lo que les diferencia de los AGCL que por el contrario si necesitan de la bilis para su absorción (197). En



la misma línea, ocurriría exactamente igual con la falta de lipasa pancreática en el duodeno, que también depende a su vez de la falta de colecistoquinina. En este caso, como los TGCM contienen ácido caprílico (8C) y ácido cáprico (10C), estos se hidrolizan mediante las lipasas gástrica, lingual, e intestinal, lo que permite ser absorbidos de manera rápida, sin necesitar la presencia de lipasa pancreática ni el proceso de emulsión gracias a la bilis. También habría que destacar que en el enterocito tampoco se reesterifican, lo que conlleva que no circulen a nivel linfático, sino que son transportados por la vena porta ya que pueden entrar en las células intestinales en forma de diglicéridos y monoglicéridos. Estos a su vez se hidrolizan mediante la lipasa de la mucosa de estas células, transformándose en AGCM y glicerol; mientras que los AGCM libres se unen a albúmina y son transportados al hígado vía sanguínea a través de la vena porta (Figura 7). Este proceso se realiza de manera especialmente rápida, como consecuencia de que la velocidad del flujo sanguíneo portal es más alta que la linfática (198).

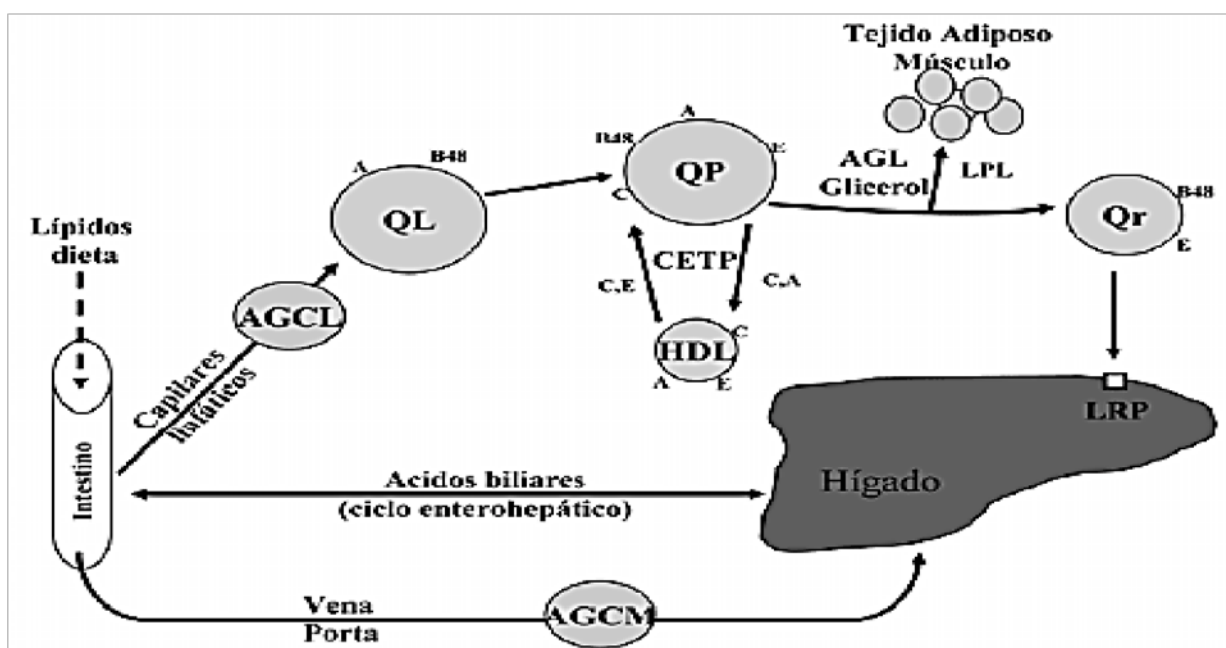


Figura 7. Metabolismo y absorción tanto de los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) como de los ácidos grasos de cadena media (AGCM). QL: quilomicrón linfático; QP: quilomicrón plasmático; HDL: lipoproteínas de alta densidad; AGL: ácidos grasos libres; LPL: lipoproteinlipasa; Qr: quilomicrón remanente; LRP: receptor del quilomicrón (199).

Por otro lado, parece que los AGCM podrían tener una función saciante del apetito a través de ciertos mecanismos que se dan tras la absorción, como son el aumento tanto de los ácidos grasos



libres, como de los cuerpos cetónicos obtenidos tras el metabolismo hepático (200-201). Son estos metabolitos resultantes, lo que aportan mayor interés para la actual tesis doctoral. Los AGCM, una vez absorbidos y transportados al hígado, son sometidos a β -oxidación, la cual se da especialmente en las mitocondrias de los hepatocitos (202), siendo los AGCM oxidados en mayor cantidad que los AGCL (203-204). Posteriormente, gran parte del acetyl-CoA que se produce debido a la oxidación de los AGCM a nivel mitocondrial, se emplea en la producción de estos cuerpos cetónicos.

Teniendo en cuenta el pobre desarrollo a nivel farmacológico que existe en la actualidad frente a esta enfermedad comentado previamente y la explicación fisiológica, se justifica que se suministre a los pacientes con EM, TGCM para frenar y tratar de revertir los problemas mitocondriales, y como consecuencia la muerte neuronal.

El aceite de coco es considerado como el alimento que contiene más TGCMs (205). En este sentido, cabe destacar que no es lo mismo que el aceite de palma, aunque se obtengan del mismo fruto. El de coco se extrae del endoespermo que es la pulpa blanca, mientras que el de palma se obtiene del mesocarpo, que es la capa fibrosa no comestible (Figura 9). De entre los tipos de aceite de coco, también hay tipos según el modo de extraerlo, destacando el virgen que se obtiene mediante presión en frío, la cual es mucho mejor ya que reduce considerablemente la cantidad de triglicéridos de cadena larga (TGCL).

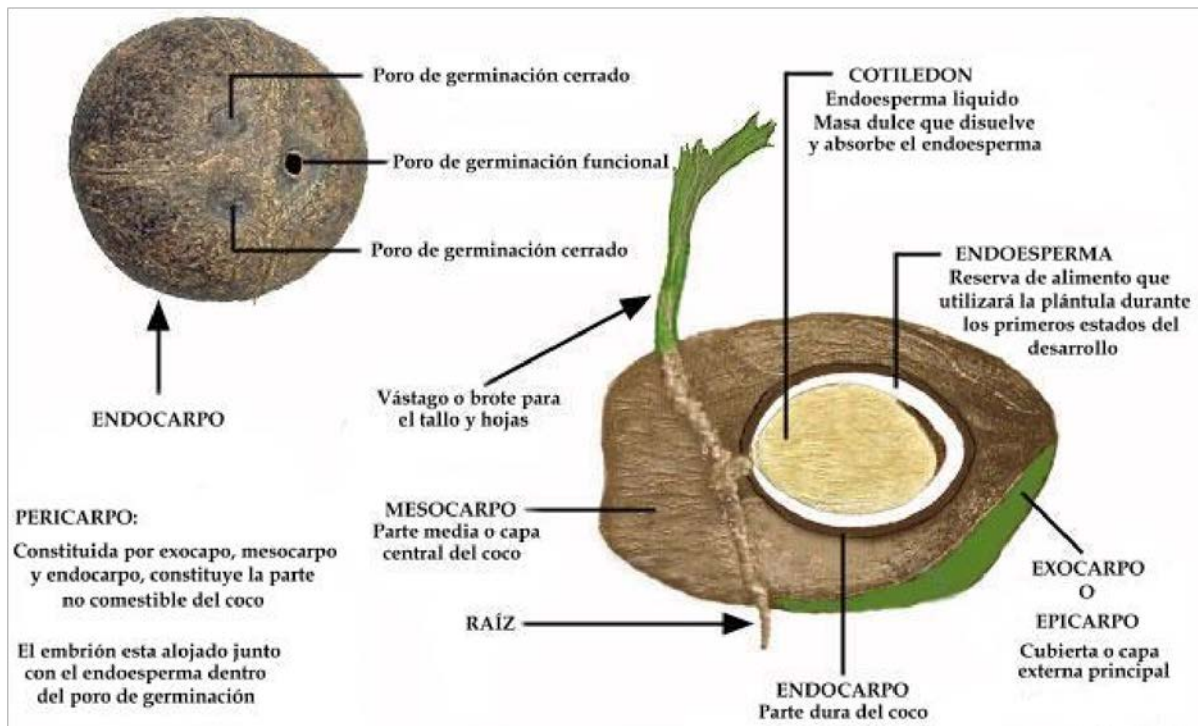


Figura 8. Diferentes partes del coco (205).

Como se puede ver en la Figura 10, el aceite de coco aporta a la dieta una altísima cantidad de AGCM. El hecho de que su aporte sea tan elevado es debido a que su composición se basa mayoritariamente en grasas saturadas, alrededor de un 90%, destacando las de cadena media. De este porcentaje, aproximadamente un 45% es de ácido láurico, seguido en grandes cantidades por el palmítico, esteárico y mirístico. Por otro lado, el ácido oleico solamente representa en torno al 6%. También destaca en su composición, la presencia de diversas vitaminas como la K y la E así como de iones como el hierro.

Calorias	862 Kcal
Agua	0 g
Proteínas	0 g
Hidratos de Carbono	0 g
Grasas	100 g
<i>de las cuales</i>	
Saturadas	86,5 g
Ácido Láurico	44,6 g
Ácido mirístico	16,8 g
Ácido palmítico	8,2 g
Ácido caprílico	7,5 g
Ácido cáprico	6 g
Ácido esteárico	2,8 g
Ácido caproico	0,6 g
Monoinsaturadas	5,8 g
Ácido oleico	5,8 g
Poliinsaturadas	1,8 g
Ácido linoleico	1,8 g
Hierro	0,04 mg
Vitamina E	0,09 mg
Vitamina K	0,5 µg

Figura 9. Composición por cada 100 gr de aceite de coco convencional (205).

Aceite de coco y mejoras antropométricas

La evidencia señala que la dieta cetogénica, o alimentos con altos contenidos en TGCM como el aceite de coco, pueden ser protectoras en procesos neurodegenerativos como ocurre en EM, demostrando una mejora cognitiva gracias a un aporte oral de TG (206-207). Este tipo de dietas poseen la capacidad de aportar un equilibrio energético al cerebro neurodegenerado, donde se evidencia una deficiencia en el uso de la glucosa, y por tanto de la energía que aporta (208-209). En esta situación de pérdida de balance energético, los cuerpos cetónicos poseen la capacidad de resolver estas alteraciones energéticas a nivel mitocondrial, ocasionando un efecto neuroprotector, como ha sido evidencia en diversos trastornos neurológicos (210-213). Este efecto se centra en diversos mecanismos. En primer lugar, el β HB, cuerpo cetónico más activo y cuya obtención se representa en la Figura 11, forma parte de un grupo de ácidos hidroxicarboxílicos que son capaces de activar determinados receptores de ácido hidroxicarboxílicos (HCA) los cuales ayudan al mantenimiento de la homeostasis en condiciones

metabólicas y dietéticas cambiantes. Es por ello que podría ser empleado en trastornos metabólicos e inflamatorios (214). Por otra parte, el aceite de coco podría modular el uso de la energía a nivel cerebral, aumentando los transportadores MCT1 y MCT4, mientras disminuye los GLUT1 encargados del movimiento de cuerpos cetónicos y glucosa a través de la BHE, y en especial en el hipocampo y corteza prefrontal (215), regiones dañadas en los pacientes afectados con EM (216-217).

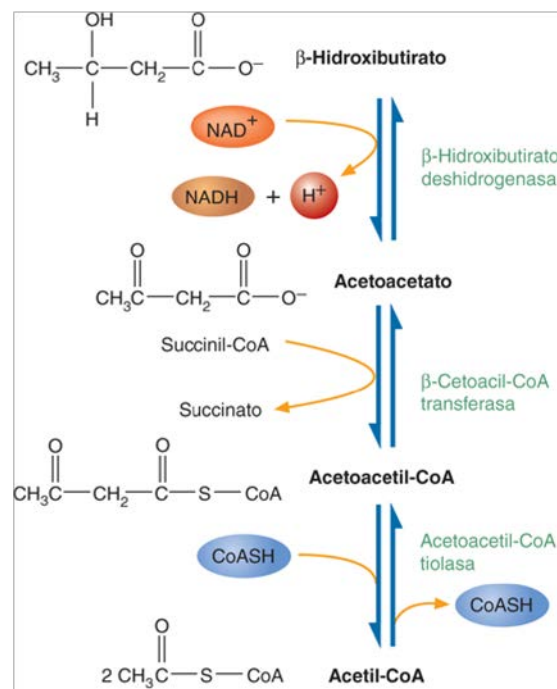


Figura 10. Conversión de acetil-CoA en betahidroxiacetil-CoA (β HBA) (218)

Igualmente, la función muscular también puede verse modificada por la acción de los cuerpos cetónicos mediante la modulación de otros mecanismos. Así pues, β HBA presenta efectos pleiotrópicos convirtiéndolo en un metabolito de señalización, que regula el estrés oxidativo y la inflamación (219) que son procesos característicos en la fisiopatología de enfermedades relacionadas con la atrofia muscular. Además, los cuerpos cetónicos poseen actividad anabólica y anticatabólica en el músculo esquelético (220-223), destacando sobre todo el β HBA (224). Por último, los cuerpos cetónicos restauran la actividad del complejo 1 de la cadena de electrones (225), que se encuentra deteriorada en la enfermedad.



Además, los TGCM pueden promover la pérdida de peso a través del aumento del efecto térmico de los alimentos. A esto habría que añadir que el consumo de grasa fomenta la saciedad, ayudando a reducir la ingesta y en consecuencia promoviendo una bajada de peso (226).

Aceite de coco y mejoras del riesgo cardíaco

En cuanto al riesgo cardíaco asociado a la ingesta de aceite de coco, a pesar de que se ha aceptado hasta la fecha que las grasas saturadas lo incrementan respecto a los aceites vegetales (destacando entre ellas el aceite de coco y la mantequilla), estas evidencias son poco consistentes o presentan grandes limitaciones como pone de manifiesto Eyres y cols, en 2016 (227). En este sentido, un estudio reciente pone de manifiesto que el aceite de coco se comporta de manera similar al aceite de oliva en relación al impacto en los niveles de colesterol en sangre (sin producir cambios en los niveles de colesterol total o LDL), e incluso aumenta los niveles de la lipoproteína HDL aceptada como un eficaz cardioprotector como se ha descrito anteriormente (228). Además, los cuerpos cetónicos procedentes de la oxidación hepática han demostrado disminuir los marcadores inflamatorios, incluida la PCR. Esto es un aspecto muy prometedor en su presumible beneficio, en la protección frente al riesgo cardiovascular de forma directa (229).





CAPÍTULO II

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Tras los antecedentes desarrollados en el marco teórico, los objetivos que se plantean en la tesis doctoral y la hipótesis de partida, son los siguientes:

2.1. Hipótesis

En relación a los objetivos planteados, se establece la hipótesis principal e hipótesis secundarias.

2.1.1. Hipótesis principal

- Una intervención basada en la asociación de aceite de coco y EGCG disminuye el nivel de inflamación, mejorando la función cardíaca de pacientes con EM.

2.1.2. Hipótesis secundarias

- El tratamiento con EGCG y aceite de coco mejora el perfil antropométrico de los pacientes con EM.
- El tratamiento con EGCG y aceite de coco mejora el perfil lipídico de los pacientes con EM. La intervención con EGCG y aceite de coco tiene un impacto positivo en el nivel de riesgo cardíaco de los pacientes con EM.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo principal (OP)

- Evaluar el impacto de la intervención de EGCG y aceite de coco en la disminución de los niveles de inflamación, relacionados con alteraciones de la función cardíaca de pacientes con EM.





2.2.2. Objetivos secundarios (OSs)

- **OS 1.** Determinar si se produce mejora antropométrica en pacientes con EM, tras tratamiento con EGCG y aceite de coco.
- **OS 2.** Valorar los cambios en el perfil lipídico en pacientes con EM, tras tratamiento con EGCG y aceite de coco.
- **OS 3.** Analizar el impacto de la intervención de EGCG y aceite de coco en el riesgo cardíaco.



CAPITULO III

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se describe todo el proceso a nivel metodológico llevado a cabo para el desarrollo de la tesis doctoral, así como el material y las técnicas instrumentales y estadísticas empleadas.

3.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio prospectivo, analítico, cuantitativo y experimental de tipo piloto.

3.2. Muestra poblacional

Los participantes del estudio fueron pacientes de EM, todos ellos miembros afiliados de diferentes asociaciones de EM en la región de la Comunidad Valenciana. Para este propósito, previamente se contactó con la dirección de cada centro para poder explicar el proyecto y ellos, a su vez, enviaron la información a los pacientes de sus respectivas asociaciones. Un total de 72 pacientes diagnosticados de la enfermedad mediante el test McDonald realizado por neurólogos (230), mostraron interés en participar. Tras el abandono inicial de 5 pacientes, finalmente 67 firmaron el consentimiento informado. De esta muestra poblacional, acudieron a la clínica para el estudio antropométrico 57 pacientes; y finalmente, para la intervención y tras aplicar los criterios de selección que se indican a continuación, se contó con 51 enfermos con la patología. Estos criterios de selección fueron concretamente:

- Pacientes de más de 18 años de edad, diagnosticados con RRMS o SPMS al menos desde hacía un año.
- Pacientes tratados con acetato de glatiramero e interferón beta, y que no habían tenido una recaída en los últimos 6 meses.

Por otra parte, los criterios de exclusión fueron:

- Mujeres embarazadas o lactantes.
- Pacientes con demencia, signos de abuso de alcohol o drogas.
- Pacientes con enfermedad cardiaca.

- Pacientes con niveles de creatina dos veces por encima de los marcadores normales.
- Pacientes que estuvieran tratados con antidepresivos.
- Pacientes con enfermedades metabólicas.
- Pacientes que hubieran sido incluidos en otros estudios.

Todo este proceso se recoge en el siguiente diagrama de flujo (Figura 12).

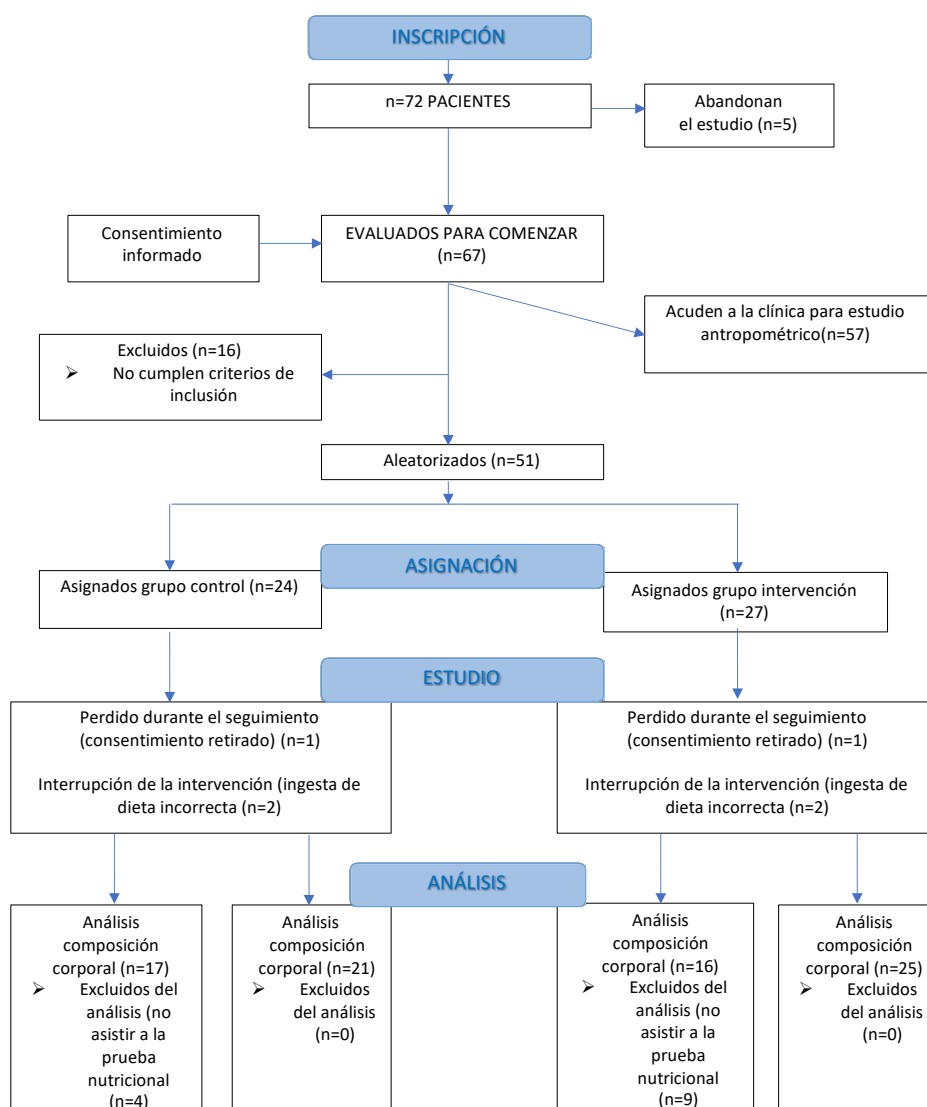


Figura 11. Diagrama de flujo que se siguió para la obtención de la muestra poblacional que formó parte del estudio.

Fuente: elaboración propia

3.3. Procedimiento

Como se ha indicado previamente, los pacientes interesados en el estudio y sus familias, recibieron una detallada información del mismo, tanto de forma verbal como escrita. Tras la



aplicación de los criterios de selección, los 51 pacientes que cumplieron los criterios de selección, registraron el consumo de sólidos y líquidos de los últimos 7 días. Una dieta isocalórica personalizada fue diseñada para cada uno de ellos, teniendo en cuenta la fisiopatología de cada paciente, en concordancia con la información obtenida de los pacientes y tras una entrevista personal sobre sus hábitos alimenticios. Para el diseño de las dietas, se empleó el software “Easydiet Programa de Gestión de la Consulta”, para lo que se tuvieron que introducir las características antropométricas de cada paciente y sus patologías, de modo que se pudieran determinar las necesidades calóricas, tanto a nivel de macronutrientes como de micronutrientes.

3.4. Intervención

Los 51 pacientes de EM fueron aleatoriamente divididos en el grupo intervención (27 pacientes) y el grupo control (24 pacientes). La aleatorización se realizó sin estratificación extrayendo consecutivamente sobres sellados con números en su interior. El grupo intervención recibió una dieta isocalórica durante 4 meses (como se ha indicado adaptada a las características individuales de cada paciente, y dividida en 5 comidas al día: desayuno, almuerzo, comida, merienda y cena) enriquecida con 60 ml de aceite de coco virgen extra divididos en 2 tomas (30 ml en el desayuno y 30 ml en la comida, proporcionándoles para ello una jeringa calibrada y pidiéndoles que administraran el contenido directamente en su boca), y suplementada con 800 mg de EGCG (administrados en dos cápsulas de 400 mg, una ingerida por la mañana y otra por la tarde). Por otra parte, el grupo control siguió la misma dieta isocalórica que el grupo intervención durante los mismos 4 meses, pero sin el aceite de coco; y se le administró un placebo (cápsulas que contenían celulosa microcristalina, con el mismo tamaño y color) para lo cual siguieron las mismas pautas que el grupo intervención. La dieta base que recibieron todos los participantes del estudio (grupo control e intervención) tuvo la siguiente distribución porcentual de los tres macronutrientes principales, en relación al valor calórico total: 20% de proteínas, 40% de carbohidratos y 40% de lípidos de naturaleza mediterránea caracterizados por no contener grandes cantidades de AGCM. De esta manera se tenía la seguridad de que los participantes del grupo control no desarrollaran cetosis, ya que los porcentajes y las cantidades de macronutrientes empleados con los pacientes del estudio no son los estipulados para una dieta clásica cetogénica (231-232). Sin embargo, la cetosis en el grupo intervención era previsible, pues un gran porcentaje del 40% de los lípidos venía del aceite de coco rico precisamente en



AGCM. En términos de catequinas, los nutrientes ricos en polifenoles, (especialmente té y café), fueron evitados a la hora de diseñar la dieta base para todos los participantes del estudio, y que se caracterizó por ser suficientemente calórica, variada y equilibrada. Esta dieta se caracterizaba por ser equilibrada, variada y con suficientes calorías, mediante la suministración de proporciones adecuadas de comida divididas en las 5 tomas diarias. Se destacó la necesidad del consumo de proteínas con un alto valor biológico de origen animal como: pescado fresco, huevos y productos lácteos (leche, yogur y queso); en detrimento de la carne y sus productos.

3.5. Mediciones

Las siguientes medidas se realizaron antes y después de la intervención de 4 meses, en las mismas condiciones y al mismo tiempo. En el caso específico de las escalas, fueron llevadas a cabo por el mismo neurólogo asignado a cada paciente antes del estudio.

3.5.1. Mediciones antropométricas

Se llevaron a cabo las siguientes medidas: peso, altura, pliegues cutáneos y perímetros y diámetros, utilizando el método de Faulkner. Un antropometrista ISAK nivel 3 certificado, tomó las medidas (233). Para medir el peso corporal (kg), se solicitó a los participantes que usaran ropa ligera, se quitaran los zapatos y se pusieran de pie en el centro de la báscula, mirando hacia adelante, con las extremidades superiores descansando a ambos lados del cuerpo y tratando de distribuir el peso por igual en ambos pies. La altura (cm) se midió sin que usaran zapatos, con el sujeto en bipedestación estática y con los pies juntos, especificando que los talones formaban un ángulo de 45°, y asegurando que la cabeza estuviera en una posición de plano Frankfort. La circunferencia de la cintura (cm) se tomó en el punto entre la parte inferior de la última costilla y la parte más alta de la cadera, al final de una exhalación normal y con los brazos relajados a cada lado del cuerpo. La circunferencia de la cadera se tomó con el sujeto de pie, con las piernas y las rodillas juntas y los glúteos relajados. Para los pliegues cutáneos se colocó la cinta antropométrica en la circunferencia máxima de los glúteos, perpendicular al eje longitudinal del torso. Los puntos anatómicos necesarios (tricipital, bicipital, subescapular, suprailíaco, creta ilíaca y abdominal) se marcaron con un lápiz dermográfico antes de tomar medidas de pliegues cutáneos. Todos los pliegues cutáneos (mm) se tomaron del lado derecho del participante. La relación cintura-cadera (RCC), que es una determinación antropométrica para valorar los niveles



de grasa abdominal, se determinó empleando la relación entre la circunferencia de la cintura y la circunferencia de la cadera (234).

El riesgo cardiovascular obtenido a partir de la RCC, que se basa en la clasificación ofrecida por Yusuf y cols. (235), fue calificado como riesgo alto (≥ 1 en hombres; 0.85 en mujeres), moderado (0.96–1.0 en hombres; 0.81–0.85 en mujeres) y bajo (≤ 0.95 en hombres; 0.80 en mujeres). La relación cintura-altura (RCA) se determinó calculando la relación entre las medidas de cintura y altura (236). La ecuación de Faulkner se empleó para calcular el porcentaje de masa magra (237). En cuanto al peso óseo, este se calculó con la fórmula de Rocha (238), mientras que para determinar el peso muscular con el que se obtuvo el porcentaje de masa muscular, se utilizó la fórmula de Matiegka (239).

El equipamiento usado para estas medidas fue: una balanza clínica portátil, modelo SECA, con una capacidad de 150-200kg y con una precisión de 100g; un estadiómetro, modelo SECA 220 Hamburg, Germany con precisión de 0,1 cm; una pinza mecánica de pliegues cutáneos, modelo Holtain LTD Crymych UK, con una precisión de 0,2 mm y un rango de medida de 0 a 48 mm; un lápiz dermatográfico; una cinta antropométrica de metal inextensible y estrecha, modelo Lufkin W606PM con una precisión de 0,2 mm; y un paquímetro bicondilar para medir el diámetro de los huesos pequeños, modelo Holtain, con una precisión de 1 mm y un rango de medida de 0 a 140 mm (240).

3.5.2. Análisis de sangre y marcadores

Para las determinaciones séricas se llevó a cabo una analítica de sangre; para lo cual se obtuvieron muestras de sangre de todos los pacientes a las 11 a.m. con estómago vacío, a partir de la vena periférica (cubital). Las muestras de sangre se recogieron en tubos de recolección de sangre sérica BD Vacutainer Plus (Ref. 367815), dejándose a continuación durante 30 minutos para su coagulación. La parte coagulada se separó centrifugando las muestras a 4000 revoluciones/minuto durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada. Después de la centrifugación, el líquido sobrenadante (suero sanguíneo) se transfirió a alícuotas de 0,5 ml que se congelaron y se almacenaron a -80°C . Finalmente, a las 24 horas las alícuotas se descongelaron y se realizaron las determinaciones

La concentración de BuChE se determinó por medio de un método descrito previamente por Tecles y cols. (241). La IL-6 se midió usando la técnica de inmunoensayo ELISA (EnzymeLinked ImmunoSorbent Assay) (R&D Systems). El cortisol se midió igualmente



mediante un inmunoensayo quimioluminiscente utilizando kits comerciales (Immulite). Mientras que los niveles de β HB se midieron con un kit comercial (Randox Laboratories, Crumlin, UK) y la actividad PON1 utilizando 4-nitrofenil acético (242). La LDL, HDL, APOA-1 y TG también se midió utilizando el analizador (Olympus A400, Tokyo, Japan) y utilizando las instrucciones del fabricante. La Hp se determinó por un método colorimétrico (Tridelta Development Ltd., Kildare, Irlanda) en un analizador automático (Cobas Mira Plus, ABX Diagnostica, Montpellier, Francia). Finalmente, la concentración de PCR y albúmina se midió mediante reactivos comerciales (Beckman Coulter, OSR6147 en el caso de PCR y OSR6102 en el caso de la albúmina).

Todos los análisis mostraron una imprecisión intra e interanálisis menor al 10%.

3.5.3. Escala Expandida de Estado de Discapacidad (EDSS)

La escala EDSS o test de Kurtzke se utiliza para determinar la discapacidad funcional en pacientes de EM (243). Consiste en una escala ordinal, que se basa en una valoración neurológica de los ocho sistemas funcionales, que son: el piramidal, el cerebelar, el tronco del encéfalo, el mental, el sensorial, el visual, el intestinal y el vesical; además de una evaluación de la capacidad de marcha. Como resultado, se obtiene un índice de discapacidad que oscila entre 0 y 10, donde 0 representaría tener una salud normal y 10 la muerte por EM.

3.6. Consideraciones éticas

El estudio se desarrolló siguiendo las directrices de la Declaración de Helsinki (244), una vez el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Humana del Comité de Ética en Investigación Experimental de la Universidad de Valencia (número de procedimiento H1512345043343).

3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la herramienta SPSS v.23 (IBM Corporation, Armonk, UN, USA). Los datos se presentan, como media \pm desviación estándar, mediana y rango, o número de pacientes y porcentaje. Los datos categóricos se analizaron utilizando un



test chi-cuadrado. Para las variables cuantitativas, en primer lugar, se determinó la distribución de las variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Para conocer las diferencias entre los grupos control e intervención al inicio del estudio, se utilizó una prueba t de Student para muestras independientes en el caso de que las variables fueran paramétricas; en caso de ser no paramétricas, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Para conocer el efecto del tratamiento, comparando los valores pre y post dentro de cada grupo, se utilizó una prueba t de Student para muestras dependientes, en el caso de las variables paramétricas; y un test de Wilcoxon, en el caso de las variables no normales. También se utilizó un test de Spearman de dos colas para analizar la correlación. Los análisis también incluyeron un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (medidas repetidas; pre-test a post-test) por 2 (entre sujetos; grupos). Un valor p por debajo de 0.05 se consideró significativo.





CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

En la presentación de los resultados, y tras establecer las características de la población de estudio, para una mayor comprensión de los mismos se seguirá el orden de los OSs planteados derivados del OP, tratando de dar respuesta a los mismos.

4.1. Cambios antropométricos en pacientes con esclerosis múltiple (EM), tras tratamiento con epigalocatequina galato (EGCG) y aceite de coco (OS 1)

Se contó finalmente con una muestra poblacional de 51 pacientes diagnosticados con EM, de los cuales el 72,5% tenía EMRR y el 27,5% tenía EMPS. Los pacientes en el estudio tenían entre 22 y 70 años de edad, con porcentajes de ambos sexos (70,6% mujeres) que representan lo que actualmente se considera para la enfermedad (245-246). Para esta población, como se describe en el apartado de material y métodos, se determinó el estado antropométrico. Las variables antropométricas de la muestra poblacional: peso, altura, IMC, circunferencia de la cintura, circunferencia de la cadera, RCC y RCA, se muestran en Tabla 1, en la que se tuvo en cuenta el sexo de los pacientes.

Tabla 1. Valores antropométricos de la muestra poblacional de pacientes con esclerosis múltiple (EM)

	Mujeres		Hombres		Total	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Peso (kg)	67.37	13.91	75.59	16.28	69.94	15.04
Altura (cm)	162.00	6.60	171.84	6.35	165.26	7.91
IMC (kgm ²)	25.80	5.10	25.69	5.92	25.70	5.31



Circunferencia cintura (cm)	96.18	13.13	94.49	10.37	95.40	11.81
-----------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------



	Mujeres		Hombres		Total	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Circunferencia cadera (cm)	108.70	12.45	98.81	10.69	104.14	12.56
RCC	0.89	0.09	0.96	0.08	0.92	0.09
RCA	0.60	0.08	0.55	0.07	0.58	0.08

IMC: Índice de masa corporal; RCC: relación cintura-cadera; RCA: relación cintura-altura; DE: Desviación estándar.

Para el análisis antropométrico, también se determinaron los valores medios de los marcadores IL-6 y PON1 relacionados con el estado de inflamación y oxidación vinculados con el perfil antropométrico, que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Niveles en sangre de biomarcadores de inflamación y oxidación vinculados al estado antropométrico, determinados en la muestra poblacional de pacientes con esclerosis múltiple (EM)

	Mujeres		Hombres		Total	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
IL-6 (pg/ml)	3.44	3.07	3.96	4.21	3.43	3.27
PON1(UI/L)	2.80	0.70	3.06	0.60	2.86	0.68

IL-6: interleuquina 6 (valor medio de IL-6 normal 1,4 pg/ml); PON1: paraoxonasa 1; DE: desviación estándar

Obesidad abdominal. Relación con la interleuquina 6 (IL-6)

Además, en este estudio antropométrico, se valoró la presencia o no de obesidad abdominal. En este sentido, 50 pacientes (87,7%) presentaron obesidad abdominal, mientras que 7 (12,3%) no la presentaban. En la siguiente tabla (Tabla 3) también se muestran los valores medios comparados de las variables antropométricas: peso, altura, IMC, circunferencia de la cintura, circunferencia de la cadera, RCC, RCA y porcentaje de grasa; entre los pacientes con obesidad abdominal y los que no la mostraron, teniendo en cuenta que ambos grupos tenían una media de edad, peso y talla similar. Al analizar la comparación, el IMC, el porcentaje de grasa corporal, la circunferencia de la cintura, la RCC y la RCA fueron significativamente más altos en los pacientes con obesidad abdominal. Sin embargo, no hubo diferencias en la circunferencia de la



cadera.

Tabla 3. Comparación de variables antropométricas entre pacientes con o sin obesidad abdominal

	Sin obesidad abdominal <i>n</i> = 7		Con obesidad abdominal = 50		<i>Z</i>	<i>p</i>
	Media	DE	Media	DE		
Edad (años)	41.00	18.46	51.48	9.36	-1.547	0.122
IL-6 (pg/ml)	1.77	0.80	3.79	3.43	-2.087	0.037 *
PON1 (UI/L)	2.97	0.20	2.90	0.71	-0.386	0.700
Peso (kg)	67.86	7.85	77.66	14.34	-1.555	0.120
Altura (cm)	172.80	4.49	165.47	9.17	-1.661	0.097
IMC (kg/m ²)	22.87	3.49	28.54	5.02	-2.394	0.017 *
Circunferencia de la cintura (cm)	80.90	5.27	97.53	10.99	-3.215	0.001 *
Circunferencia de la cadera (cm)	100.00	8.60	104.74	13.02	-0.673	0.501
RCC	0.82	0.12	0.94	0.07	-2.338	0.019 *
RCA	0.47	0.02	0.59	0.07	-3.576	0.000 *
Porcentaje de grasa	16.68	3.00	21.36	4.30	-2.052	0.040 *

IMC: índice de masa corporal; RCC: relación cintura-cadera; RCA: relación cintura-altura; DE: desviación estándar; Z: prueba U de Mann-Whitney; * diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$

Al comparar los niveles de los marcadores bioquímicos en sangre, la IL-6 es significativamente más alta en los pacientes con obesidad abdominal, mientras que no existen diferencias en los valores medios de la actividad de PON1 (Tabla 4).



Tabla 4. Comparación de los niveles en sangre de marcadores bioquímicos entre pacientes con o sin obesidad abdominal

	Sin obesidad abdominal		Con obesidad abdominal		Z	p
	Media	DE	Media	DE		
IL-6 (pg/ml)	1.77	0.80	3.79	3.43	-2.087	0.037 *
PON1 (UI/L)	2.97	0.20	2.90	0.71	-0.386	0.700

IL-6: interleuquina 6; PON1: paraoxonasa 1; DE: desviación estandar; Z: prueba U de Mann-Whitney; *diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$

Finalmente, siendo la IL-6 el biomarcador que muestra diferencias entre ambos grupos, se determinó la relación entre sus valores y las variables antropométricas o la PON1, pudiéndose observar una correlación positiva con la circunferencia de la cintura y RCA; por lo tanto, para esta población, cuanto mayores son los niveles de la interleuquina en el suero, mayores son los valores de estas variables. Por otro lado, no existe una correlación significativa con el IMC, la RCC, la circunferencia de la cadera, el porcentaje de grasa o la actividad de la PON1 (Tabla 5).

Tabla 5. Correlaciones de la interleuquina 6 (IL-6) con variables antropométricas y paraoxonasa 1 (PON1)

	PON1	IMC	Circunferencia de la cintura	Circunferencia de la cadera	RCC	RCA	Porcentaje de Grasa
Coef.	0.318	0.217	0.407	0.194	0.291	0.413	0.235
IL-6 (pg/ml)							
p	0.058	0.152	0.028 *	0.313	0.125	0.026 *	0.135

IL-6: interleuquina 6; PON1: paraoxonasa 1; IMC: índice de masa corporal; RCC: relación cintura-cadera; RCA: relación cintura-altura; Coef.: Coeficiente de correlación de Spearman; * correlaciones estadísticamente significativas $p < 0,05$

Cambios antropométricos

Después del análisis antropométrico de la población, el siguiente paso fue determinar los cambios tras la intervención. Estas variables sociodemográficas, en las que también se incluye el peso, el IMC y el porcentaje de masa grasa y de músculo, mostraron valores similares entre los grupos antes de la intervención (Tabla 6).

Tabla 6. Características sociodemográficas de la población de estudio (grupo control y grupo intervención)

		GC (N = 24)	GI (N = 27)	Total (N = 51)	Chi ²	p
Sexo	Mujer	14 (58.3)	22 (81.5)	36 (70.6)	3.279	0.07
	Hombre	10 (41.7)	5 (18.5)	15 (29.4)		
Recurrente– remitante Tipo EM	Secundaria	17 (70.8)	20 (74.1)	37 (72.5)	0.067	0.80
	progresiva	7 (29.2)	7 (25.9)	14 (27.5)		
		Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Z	p
Edad (años)		49.83 ± 12.42	44.56 ± 11.27	47.04 ± 12.00	-1.558	0.12
Tiempo diagnóstico (años)		14.21 ± 8.40	11.89 ± 9.74	12.98 ± 9.12	-1.418	0.16
Peso (Kg)		70.44 ± 18,13	68,63 ± 13,56	-0.245	0.806	0.435
IMC		25.72 ± 6.01	25.92 ± 5.29	-0.142	0.887	0.351
Masa grasa (%)		19.10 ± 4.96	19.34 ± 3.98	-0.370	0.71	
Masa muscular (%)		38.38 ± 4.15	39.39 ± 2.88	-0.547	0.584	

EM: esclerosis múltiple; IMC: índice de masa corporal; GC: grupo control; GI: grupo intervención; DE: desviación estándar;



Z: prueba U de Mann-Whitney

Igualmente, antes de la intervención también se cuantificó y comparó entre los grupos, los niveles de diferentes moléculas o marcadores bioquímicos, como β HB, BuChE, la actividad de la PON1, IL-6, cortisol, albúmina o TG. En la misma línea de los que se observó con las variables antropométricas, estos valores fueron similares en los grupos control e intervención.

Tabla 7. Niveles en sangre de marcadores bioquímicos de la población antes de la intervención (pre-test)

Variable	GC (N =	GI (N =	Z	p
	24)	27)		
	Media \pm	Media \pm		
	DE	DE		
β HB (Mmol/L)	0.05 \pm 0.02	0.06 \pm 0.04	-0.932	0.35
BuChE (UI/L)	6.23 \pm 1.48	5.79 \pm 1.48	-1.231	0.22
PON1 (UI/L)	2.88 \pm 0.77	2.67 \pm 0.62	-0.832	0.41
IL-6 (pg/ml)	3.67 \pm 2.94	3.66 \pm 4.10	-0.705	0.48
Cortisol (μ g/dl)	15.50 \pm 5.86	12.22 \pm 4.59	-1,930	0.054
Albúmina (g/dl)	4.66 \pm 0.41	4.69 \pm 0.29	-0.414	0.679
TG (mg/dl)	112,8 \pm 50	110,2 \pm 55,38	-0.852	0.896

β HB: β -hidroxibutirato; BuChE: butirilcolinesterasa; PON1: paraoxonasa 1; IL-6: interleuquina 6; TG: triglicéridos; GC: grupo control; GI: grupo intervención; DE: desviación estándar; Z: prueba U de Mann-Whitney

Posteriormente, tras los 4 meses de tratamiento, al comparar los cambios dentro de cada uno de los grupos se observó como el porcentaje de grasa (que se encontraba dentro de los valores de normalidad para el rango de edad en la población de estudio para ambos grupos (19,10 \pm 4,96% en el grupo control y 19,34 \pm 3,98% en el grupo intervención)), solo disminuyó en el grupo que recibió la intervención. Esta disminución en los niveles de masa grasa, estaría relacionada con la mejoría significativa después de la intervención que se produjo también en los porcentajes de la masa magra, donde se pasó de 38,01 \pm 4,02% a 41,10 \pm 2,81%, y que no ocurrió en el grupo control que paso de 38.38 \pm 4.15% a 38.01 \pm 4.02%.



En cuanto a las otras variables antropométricas que se determinaron, se produjeron disminuciones significativas en la RCC y el peso de grasa en el grupo intervención, mientras que no se observaron cambios en el grupo control. Finalmente, en términos de peso total, se detectó una disminución significativa en ambos grupos (Tabla 8).



Tabla

8. Cambios antropométricos tras la intervención, tanto en el grupo intervención como en el control (mediciones Pre y Post)

Grupo Control	Pre (N = 17)		Post (N = 17)		Z	p
	Mediana	Rango	Mediana	Rango		
RCC	0.93	0.39	0.94	0.40	-0.492	0.623
Masa grasa corporal (%)	18.19	16.19	17.72	19.22	-0.644	0.520
Peso de la grasa (Kg)	12.61	26.77	12.71	28.10	-0.355	0.723
Masa muscular (%)	38.88	16.30	39.10	17.69	-1.738	0.082
Peso (kg)	62.45	68.60	61.00	63.00	-2.723	0.006 *
Grupo Intervención	Pre (N = 16)		Post (N = 16)		Z	p
	Mediana	Rango	Mediana	Rango		
RCC	0.90	0.35	0.88	0.30	-2.183	0.029 *
Masa grasas corporal (%)	19.40	14.50	17.63	13.34	-4.421	0.000 ***
Peso de la grasa (Kg)	12.95	20.85	11.17	18.51	-4.373	0.000 ***
Masa muscular (%)	39.77	12.68	40.68	11.97	-2.955	0.003 **
Peso (kg)	64.50	56.10	65.50	53.00	-3.076	0.002 **

RCC: relación cintura-cadera; Z: test de Wilcoxon; *diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$; ** diferencias estadísticamente significativas $p < 0.01$; ***diferencias estadísticamente significativas $p < 0.005$

En este sentido, los resultados de ANOVA mostraron un efecto significativo de interacción tiempo-condición. Por lo tanto, observamos que RCA [F (1,31) = 12,752; p = 0,001] y masa grasa [F (1,48) = 21.275; p = 0,000] de los pacientes del grupo intervención disminuyeron desde el inicio, y sin embargo, estas variables incrementaron en el grupo control. Además, la masa muscular [F (1,49) = 7975; p = 0,007] incrementó en los pacientes del grupo intervención, mientras que por el contrario se observó una disminución en el grupo control (Tabla 9).



Tabla 9. Comparación de las puntuaciones de cambio de las variables antropométricas post intervención, tanto en el grupo intervención como en el control

	Grupo Control		Grupo Inter		F	p
	N = 21		N = 25			
	Media *	DE	Media *	DE		
IMC	-0.5182	0.89418	-0.7629	1.03918	0.782	0.381
RCC Pre-Post	-0.0029	0.03016	-0.0156	0.02421	1.761	0.194
RCA Pre-Post	0.0006	0.02045	-0.0238	0.01857	12.752	0.001
Masa grasa Pre-Post (%)	0.2152	1.54251	-1.7870	1.51905	21.275	0.000
Masa muscular Pre-Post (%)	-0.5958	1.50057	0.8307	2.02952	7.975	0.007

IMC: índice de masa corporal; RCC: relación cintura-cadera; RCA: relación cintura-altura; PCR: proteína C reactiva; DE: desviación estándar; Chi2: prueba de Chi cuadrado; F: prueba de análisis de varianza (ANOVA); * Cambio medio de preprueba a post-prueba

Por otra parte, en cuanto a los biomarcadores, esta comparación intragrupo pre-post indicó una diferencia significativa solo para la IL-6 en el grupo control, que disminuyó después de 4 meses del estudio. Sin embargo, se pudieron encontrar diferencias significativas en el grupo intervención para los niveles de β HB que aumentaron. Igualmente, en el grupo intervención, BuChE, la actividad de PON1 y la albúmina aumentaron significativamente; mientras que la IL6 disminuyó significativamente, al igual que EDSS (lo que representa una mejora en la capacidad funcional). Finalmente, los valores de cortisol y TG no mostraron cambios para ninguno de los grupos (Tabla 10).

10. Comparación de las puntuaciones pre-post intervención, tanto en el grupo intervención como en el grupo control

Grupo Control	Pre		Post		Z	p
	Media	DE	Media	DE		
β HB (Mmol/L)	0.05	0.02	0.04	0.04	-1.461	0.14
IL-6 (pg/ml)	3.67	2.94	1.37	1.15	-3.245	0.001*



Tabla

BuChE (UI/L)	6.23	1.48	6.37	1.47	-1.085	0.28
PON1 (UI/L)	2.88	0.77	2.87	0.82	-1.586	0.11
Albúmina (g/dl)	4.66	0.41	4.55	0.44	-1.469	0.142
TG (mg/dl)	112,8	50	141,9	74,95	-1,034	,301
Cortisol (µg/dl)	15.50	5.86	15.62	6.49	-1.731	0.884

Grupo Intervención	Pre		Post		Z	p
	Media	DE	Media	DE		
βHB (Mmol/L)	0.06	0.04	0.10	0.10	-2.005	0.045*
IL-6 (pg/ml)	3.66	4.10	1.31	2.09	-4.074	0.000***
BuChE (UI/L)	5.79	1.48	6.41	1.76	-3.147	0.002***
PON1 (UI/L)	2.67	0.62	2.92	0.68	-3.722	0.000***
Albúmina (g/dl)	4.69	0.29	4.83	0.19	-2.375	0.018*
TG (mg/dl)	103,6	55	88,7	30	-1,399	,162
Cortisol (µg/dl)	12.22	4.59	11.77	3.89	-.317	0.751

βHB: βetahidroxibutirato; IL-6: interleuquina 6; BuChE: butirilcolinesterasa; PON1: paraoxonasa 1; TG: triglicéridos; DE: desviación estandar; Z: test de Wilcoxon; *diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$; *diferencias estadísticamente significativas $p < 0.01$* ; ****diferencias estadísticamente significativas $p < 0.005$*

Butirilcolinesterasa (BuChE)

Dada la importancia descrita en el apartado del marco teórico de la actividad de la BuChE a nivel antropométrico, en esta tesis doctoral se realizó un análisis de la enzima en mayor profundidad. En este sentido se determinó la relación de sus niveles con las variables antropométricas analizadas, y con la actividad de PON1; pudiéndose observar que hubo correlaciones positivas entre los niveles de BuChE, y los porcentajes de masa grasa, los niveles de TG en sangre también determinados y la actividad de PON1. Sin embargo, estas correlaciones no ocurrieron en el grupo control (Tabla 11).



Tabla 11. Correlación en el estudio entre butirilcolinesterasa (BhChE) y las otras variables tras la intervención (post-test), tanto en el grupo intervención como en el control

Grupo Intervención (N = 27)					
		Grasa (%)	TG (mg/dl)	PON1 (UI/L)	
BuChE (UI/L)	Coef	0.752	0.522	0.448	
	<i>p</i>	0.000 **	0.006 **	0.022 *	
Grupo Control (N = 24)					
BuChE (UI/L)	Coef	0.235	0.299	0.186	
	<i>p</i>	0.364	0.244	0.475	

Grasa (%): porcentaje de grasa corporal; TG: triglicéridos; PON1: paraoxonasa 1; BuChE: butirilcolinesterasa; Coef: coeficiente de correlación de rango de Spearman; * diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$; ** diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,01$

Albúmina-cortisol

También resulta interesante las modificaciones que se produjeron en las moléculas albúmina y cortisol, cuya actividad está relacionada, como se describe en el marco teórico. En este sentido, como se puede ver en la tabla anterior (Tabla 10), solo hubo un cambio en los niveles de albúmina, que aumentaron significativamente en el grupo intervención. En la siguiente tabla, se muestran de nuevos estos cambios, pero expresados como mediana y rango (Tabla 12).



Tabla

12. Comparación antes del tratamiento (pre) y después (post) de los valores de albúmina y cortisol entre los grupos control e intervención

Grupo control	Pre (N = 21)		Post (N = 21)		Z	p
	Mediana	Rango	Mediana	Rango		
Cortisol (µg/dl)	16.30	23.85	13.10	29.36	-1.731	0.884
Albúmina (g/dl)	4.65	1.43	4.69	1.80	-1.469	0.142
Grupo Intervención	Pre (N = 25)		Post (N = 25)		Z	p
	Mediana	Rango	Mediana	Rango		
Cortisol (µg/dl)	11.90	18.44	11.05	18.01	-0.317	0.751
Albúmina (g/dl)	4.65	1.14	4.81	0.86	-2.375	0.018 *

Z: test de Wilcoxon; *diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$

Estos resultados, podrían determinar una disminución en las concentraciones de cortisol libre en el grupo intervención.

Haptoglobina (Hp)

Viendo que a nivel muscular únicamente se observaron mejoras significativas en el grupo intervención, a continuación, se realizó un análisis más profundo sobre el rol de la molécula Hp en estas mejoras. En este sentido, se pudo observar cómo los niveles de Hp en la sangre no variaron (pasando de $369,09 \pm 97,82$ mg/dl a $390 \pm 91,15$ mg/dl) (Figura 12).

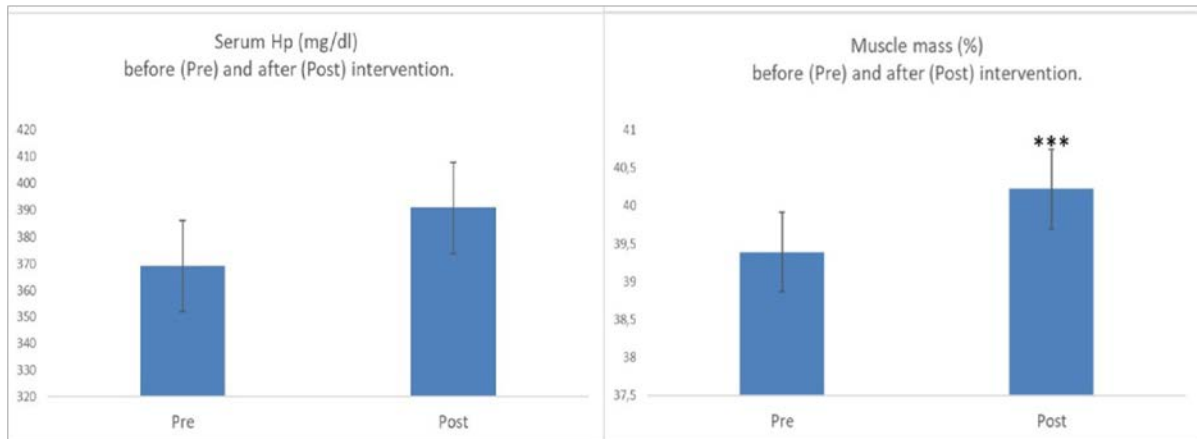


Figura 12. Cambios obtenidos en el grupo intervención en los niveles de Haptoglobina (Hp) y porcentaje de músculo, al comparar las variables antes (pre) y después (post). Test de Wilcoxon se usó para ver las diferencias antes y después de la intervención. *** diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

También se analizó la relación entre los niveles de Hp y la IL-6 como marcador de inflamación, pudiéndose observar cómo antes de la intervención la proteína muestra una correlación significativa y positiva con la secreción de IL-6, y negativa con el porcentaje muscular (Tabla 13).

Tabla 13. Correlaciones de haptoglobina con interleuquina 6 (IL-6) y porcentaje de masa muscular (% muscular), antes (pre) y después (post) de la intervención

Variable	IL-6 Pre		% Músculo Pre	
	Coef	Sig	Coef	Sig
Hp Pre (mg/dl)	0.657	0.004 **	-0.682	0.001 **
IL-6 Post				
Hp Post (mg/dl)	0.527	0.007 **	-0.292	0.148

Hp: haptoglobina; IL-6: interleuquina 6; Coef: coeficiente de correlación de rango de Spearman; **: diferencias estadísticamente significativas $p < 0,005$

4.2. Cambios en el perfil lipídico en pacientes con esclerosis múltiple (EM), tras tratamiento con epigallocatequina galato (EGCG) y aceite de coco (OS 2)

Respondiendo al segundo objetivo secundario de la tesis, se realizó un análisis del impacto de la intervención en los niveles de los principales lípidos en sangre de la población de estudio. Los niveles previos a la intervención, de: colesterol total, TG (ya mostrados anteriormente), LDL, HDL y APOA-1 tanto del grupo control como del grupo intervención, se muestran en la siguiente tabla, pudiéndose observar que no existían diferencias entre ambos grupos.



Tabla

Tabla 14. Parámetros lipídicos al inicio del estudio tanto en el grupo intervención como en el control

	Grupo control	Grupo intervención	Media±DE	Media±DE
<i>p</i>				
CT (mg/dl)		210,8 ± 39,39	220,9 ± 35,96	.873u
TG (mg/dl)		112,8 ± 50	110,2 ± 55,38	.896u
LDL (mg/dl)		133,4 ± 34,1	131,9 ± 24,07	.976t
HDL (mg/dl)		76,56 ± 15,22	84,81 ± 18,05	.249u
APOA-1 (mg/dl)		167,6 ± 21,77	178,7 ± 22,54	.126u

CT: colesterol total; TG: triglicéridos; LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; APOA-1: apolipoproteína A1; DE: desviación estándar. Prueba *t* de Student.



Estos valores se encuentran ligeramente por encima de la normalidad para los valores de colesterol total y de LDL. Sin embargo, el resto de las lipoproteínas, APOA-1, HDL y TG, se sitúan en rangos de normalidad (247-248).

Tras la intervención, al comparar las mediciones entre grupos del perfil lipídico, se pudieron observar algunas diferencias (Figura 14). Concretamente, los niveles de CT aumentaron significativamente en ambos grupos, pasando de $210,8 \pm 39,39$ mg/dl a $236,4 \pm 63,2$ mg/dl ($t = -2,790$; $p = 0,013$) en el grupo control; y de $220,9 \pm 35,96$ mg/dl a $232,5 \pm 41,89$ mg/dl ($z = 2,085$; $p = 0,037$) en el grupo intervención. El HDL aumentó solo en el grupo control, pasando de $76,6 \pm 15,2$ mg/dl a $86 \pm 14,2$ mg/dl ($z = -2,533$; $p = 0,011$); mientras que en el grupo intervención se mantuvieron constantes ($84,8 \pm 18,1$ mg/dl y $87,9 \pm 16,2$ mg/dl en las mediciones pre y post, respectivamente). LDL y APOA-1, no mostraron diferencias significativas en ninguno de los grupos, aunque hubo una tendencia a aumentar los niveles de APOA-1 en el grupo control.

Los niveles de TG, como se ha indicado anteriormente, mostraron diferentes tendencias en cada grupo, aunque ninguno de ellos alcanzó significación estadística. Concretamente hubo una tendencia a un aumento en el grupo control, pasando de $112,8 \pm 50$ mg / dl a 142 ± 75 mg / dl, y una tendencia a una disminución en el grupo intervención, pasando de $103,6 \pm 55$ mg/dl a $88,7 \pm 30$ mg/dl ($z = -1.399$; $p = 0,162$). Sin embargo, al realizar el análisis de los parámetros lipídicos después del tratamiento por medias de muestra independientes, sí se encuentran diferencias significativas, con niveles más bajos en el grupo intervención ($z = -2.201$, $p = .028$). Estos resultados se muestran gráficamente en la Figura 14.

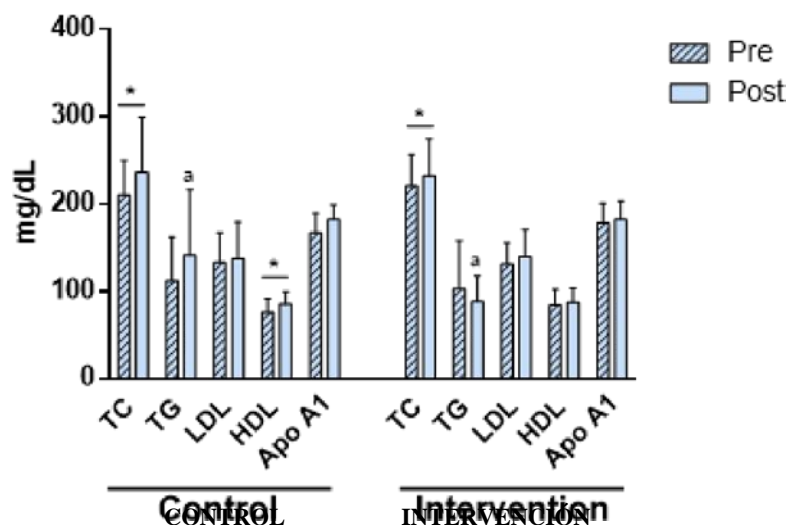


Figura 13. Perfil lipídico antes y después de la intervención en los grupos control e intervención. TC: colesterol total; TG: triglicéridos; LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; APOA-1: Apolipoproteína A1. Prueba t de Student. * $p < 0.05$ para comparaciones dentro de cada grupo; a: $p < 0.05$ para comparaciones entre grupos.

Triglicéridos (TG)

Viendo que la única diferencia en la tendencia de cambio entre ambos grupos, únicamente se de en los niveles de TG, donde en el grupo intervención se produjo una disminución significativa respecto a los niveles iniciales; y teniendo en cuenta la relación establecida por otros autores entre los niveles de esta lipoproteína y la capacidad funcional en pacientes con EM, se analizó a continuación la relación entre los valores de la escala EDSS (escala de capacidad funcional), y los niveles de TG y PCR como marcador de inflamación. Este análisis muestra que únicamente en el grupo intervención, existe significación en estas correlaciones tras el tratamiento. Concretamente, en cuanto a los TG sus niveles en sangre correlacionan significativamente con los valores de EDSS de manera positiva, lo que significa que los pacientes que peor estaban a nivel funcional eran los que mayores valores de TG en sangre tenían (Figura 15).

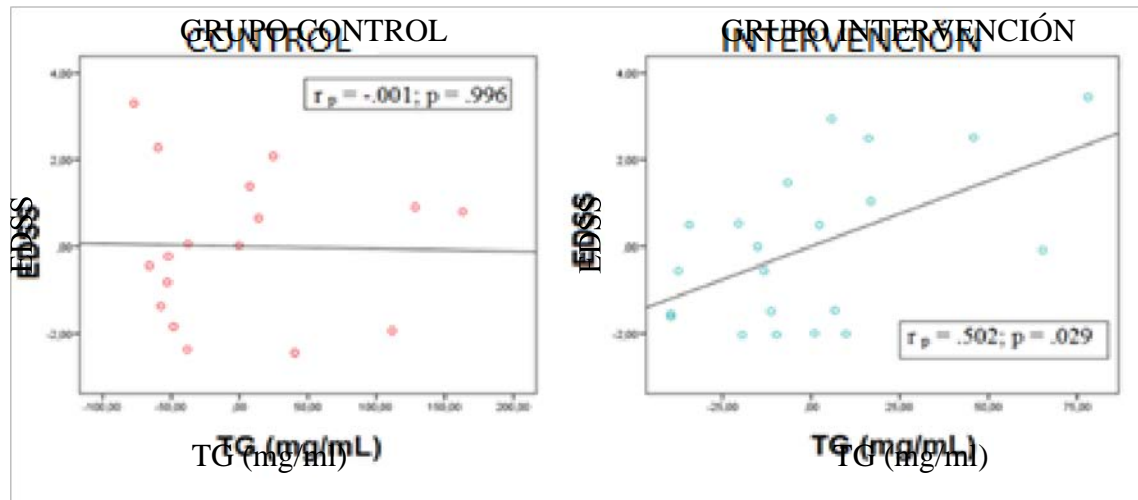


Figura 14. Correlaciones entre la actividad funcional (valores escala EDSS) y los niveles de triglicéridos (TG) después de la intervención, en los grupos control e intervención. TG: triglicéridos; EDSS: Escala Expandida de Estado de Discapacidad. Test de Spearman. Correlación estadísticamente significativas $p < 0,005$

Mientras que, en cuanto a la PCR, esta correlación se da igualmente de manera positiva, lo que podría indicar que los pacientes más inflamados son los que tienen los niveles de discapacidad funcional más alta (Figura 16).

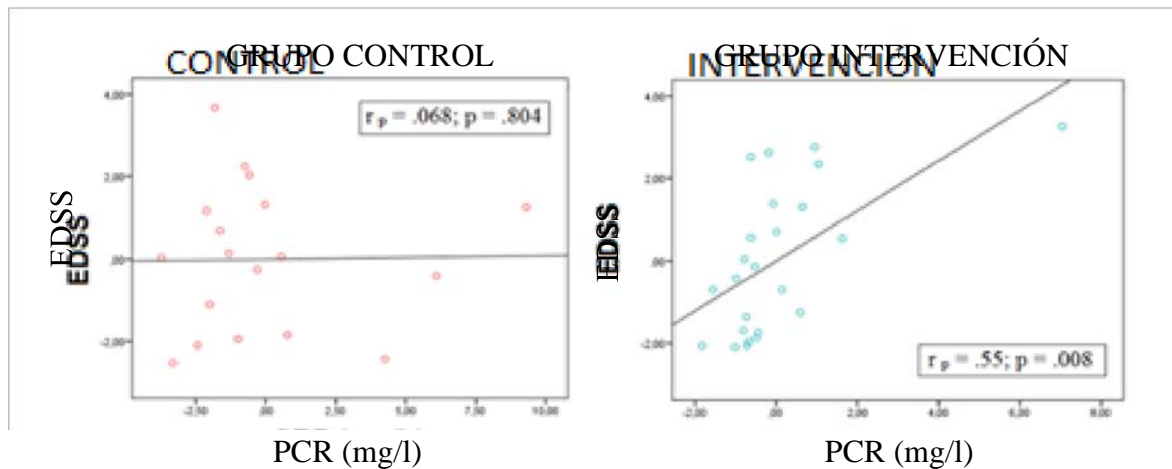


Figura 15. Correlaciones entre la actividad funcional (valores escala EDSS) y los niveles de Proteína C reactiva (PCR) después de la intervención, en los grupos control e intervención. PCR: proteína C reactiva; EDSS: Escala Expandida de Estado de Discapacidad. Test de Spearman. Correlación estadísticamente significativas $p < 0,005$



4.3. Impacto de la intervención con aceite de coco y EGCG en el riesgo cardíaco (OS 3)

En cuanto a las mejoras del tratamiento a nivel cardíaco, tras el periodo de intervención se pudieron observar algunas diferencias significativas entre el grupo control y el grupo intervención. Para determinar estos cambios, se analizaron determinadas variables ya indicadas en apartados anteriores de este capítulo de resultados relacionadas con la actividad cardíaca como: IMC, la actividad de la PON1, RCC, RCA, porcentaje de masa grasa, porcentaje de masa muscular, albúmina y PCR.

Como ya se ha indicado previamente, únicamente el grupo intervención mostró valores significativamente más bajos en RCC; y más altos en la actividad de PON1, masa muscular y albúmina. Todos estos resultados se vuelven a mostrar en la Tabla 15.

Tabla 15. Comparativa entre los grupos control e intervención tras el tratamiento, de los valores obtenidos en las diferentes variables relacionadas con el riesgo cardíaco

	Grupo Control		Grupo Intervención		Z	p
	N = 21		N = 25			
	Media	DE	Media	DE		
IMC	25.36	5.85	25.16	4.94	-0.068	0.946
PON1(UI/L)	2.49	0.79	2.97	0.65	-0.369	0.001***
RCC	0.94	0.08	0.87	0.09	-1.969	0.049*
RCA	0.60	0.09	0.55	0.07	-1.515	0.130
Masa Grasa (%)	19.01	5.26	17.74	3.32	-0.701	0.483
Masa muscular (%)	38.01	4.02	41.10	2.81	-2.115	0.023*
Albúmina (g/dL)	4.55	0.44	4.83	0.19	-2.316	0.021*
PCR (mg/L)	4.72	3.55	3.50	2.02	-1.671	0.095

PON1: paraoxonasa 1; RCC: relación cintura-cadera; RCA: relación cintura-altura; PCR: proteína C reactiva; DE: desviación estándar; Z: prueba U de Mann-Whitney; * diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$; *** diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,005$

Además, algunas de estas variables antropométricas, sirvieron para calcular el riesgo cardíaco (tal como se describe en el capítulo de material y métodos). Y en este sentido, se pudo observar cómo, en cuanto al riesgo cardíaco, tras la intervención no se observaron diferencias significativas en el grupo control. Sin embargo, si se observaron cambios significativos en el grupo intervención en relación a la distribución de pacientes en los diferentes grupos de riesgo cardíaco (tanto alto, como moderado y bajo); concretamente, disminuyó el número de personas con alto riesgo cardíaco y aumentó el de los que presentaban o moderado o bajo riesgo (Tabla 16, Figura 17).

Tabla 16. Comparativa entre los grupos control e intervención tras el tratamiento, en los niveles de riesgo cardíaco

	Grupo Control		Grupo Intervención		Chi2	p
	N = 17	N = 16	N = 16	N = 16		
Riesgo Cardíaco	Freq	%	Freq	%		
Bajo	8	47.1%	6	37.5%	2.343	0.310
Moderado	1	5.9%	4	25.0%		
Alto	8	47.1%	6	37.5%		

Chi2: prueba de Chi cuadrado; Z: prueba U de Mann-Whitney

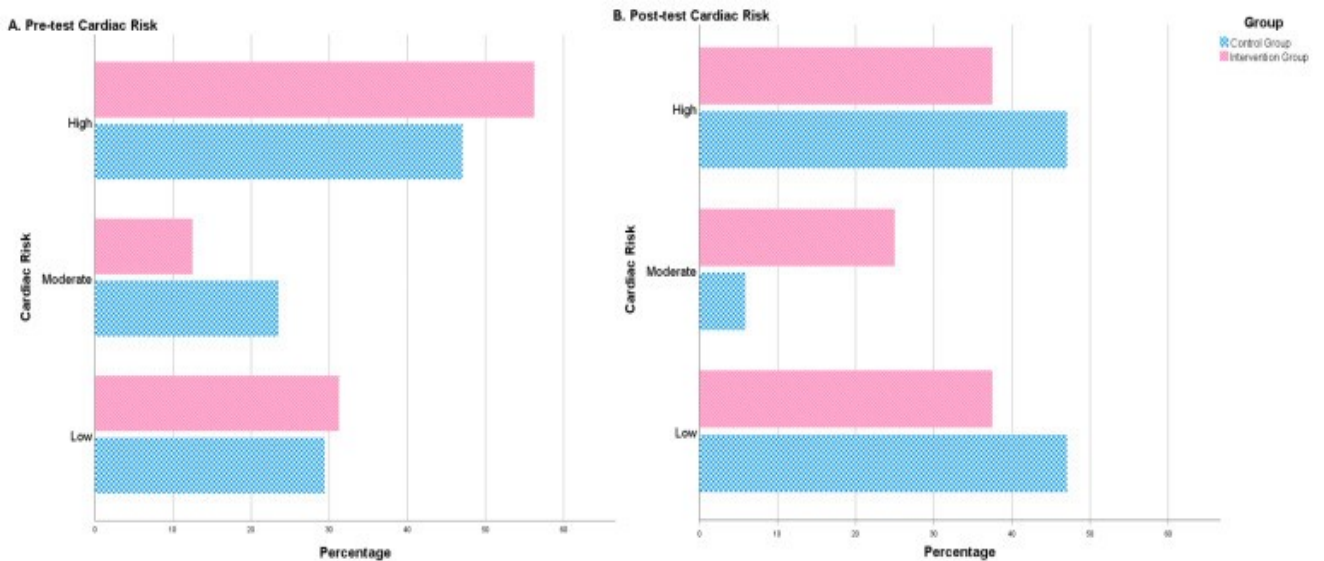




Figura 16. Comparativa del porcentaje de pacientes con riesgo cardíaco bajo, moderado o alto, antes del tratamiento (pre test) y después del tratamiento (post-test), entre los grupos control (azul) e intervención (rosa).

Finalmente, tras aplicar la prueba ANOVA los resultados revelaron un efecto de interacción significativo en condiciones de tiempo. Por lo tanto, obtuvimos que tanto RCA [F (1.31) = 12,752; p = 0,001] como la masa grasa [F (1.48) = 21,275; P = 0,000] de los pacientes del grupo intervención disminuyeron respecto al inicio de la intervención, mientras que por el contrario aumentaron en los pacientes del grupo control. Además, la masa muscular [F (1.49) = 7975; p = 0,007], albúmina [F (1.43) = 8222; P = 0.006] y PON1 [F (1.41) = 4501; p = 0.040] aumentaron en el grupo intervención, al contrario de lo que se observó en el grupo control que mostró una disminución (Tabla 17).

Tabla 17. Comparación de las puntuaciones de cambio después de la finalización de la intervención versus el control

	Grupo Control		Intervención N = 21		F	p
	Media	DE	Media	DE		
PON1 Pre-Post (UI/L)	-.0047	.40128	.2427	.35522	4.501	.040
RCC Pre-Post	-.0029	.03016	-.0156	.02421	1.761	.194
RCA Pre-Post	.0006	.02045	-.0238	.01857	12.752	.001*
Masa Grasa Pre-Post (%)	.2152	1.54251	-1.7870	1.51905	21.275	.000*
Masa muscular Pre-Post (%)		1.50057	.8307	2.02952	7.975	.007*
		-.5958				
Albúmina Pre-Post (g/dL)	-.1353	.36632	.1435	.28599	8.222	.006*
PCR Pre-Post (mg/L)	-.3230	5.72099	-.0889	1.85873	.040	.843

PON1: paraoxonasa 1; RCC: relación cintura-cadera; Relación cintura-altura RCA; PCR: proteína C-reactiva; DE: desviación estándar; Chi2: Test de Chi cuadrado; F: prueba de ANOVA; *Cambio medio de pre-prueba a post-prueba



CAPÍTULO V

5.DISCUSIÓN

Una vez expuestos los resultados obtenidos, en este apartado de discusión se van a analizar, comparándolos con la evidencia científica publicada hasta el momento. Para ello, en la línea mostrada en el apartado de resultados, esta discusión se va a estructurar según los OSs planteados.

5.1. Mejora antropométrica en pacientes con esclerosis múltiple (EM), tras tratamiento con epigallocatequina galato (EGCG) y aceite de coco (OS 1)

Los hábitos alimentarios, que están directamente relacionadas con las características antropométricas y que fueron previamente descritas en nuestro laboratorio (49), se caracterizan especialmente por una elevada ingesta, tanto de hidratos de carbono simple como de lípidos predominantemente constituidos por AGS. Estos hábitos pueden a su vez estar relacionados con variables asociadas a la propia enfermedad, entre los que se incluyen el tratamiento farmacológico que es principalmente la ingesta de inmunomoduladores y glucocorticoides y que a su vez producen cambios en la ingesta de alimentos y aumento de peso (249). El aumento, derivado del consumo de glucocorticoides, se basa principalmente en un incremento del porcentaje de grasa abdominal (250). Por tanto, esta dieta desequilibrada, junto con otras variables y factores ambientales entre los que se encuentran la ingesta de ciertos fármacos, podría contribuir a las características antropométricas de la población de estudio.

Obesidad abdominal. Relación con la interleuquina 6 (IL-6)

En este sentido, efectivamente se observó obesidad abdominal en nuestra muestra poblacional, en un alto número de pacientes en los que el tejido adiposo en el abdomen se asoció con un IMC, circunferencia de cintura, RCC, RCA y porcentaje de grasa significativamente mayores, en comparación con pacientes sin obesidad abdominal. Resultados similares se registraron en el



estudio de Susan K. y cols. 2017, en el que el IMC se asoció positivamente con la ingesta de proteínas y lípidos y negativamente con la ingesta de carbohidratos en pacientes obesos (251).

Además, la ingesta excesiva de carbohidratos simples está relacionada con la obesidad y el sobrepeso (252), así como con un aumento del tejido adiposo en el abdomen (253). En cuanto al impacto e influencia de la ingesta dietética sobre el nivel de inflamación, hay que destacar que una ingesta excesiva de lípidos se relaciona con el estrés oxidativo y la inflamación (254255). Además, a nivel clínico, uno de los principales síntomas de la enfermedad son las alteraciones a nivel motor relacionadas con las alteraciones antropométricas observadas en la enfermedad (256). En este sentido, se ha observado que una ingesta adecuada de lípidos mejora la sensación de fatiga en pacientes con EM (257). Por ello, entre las implicaciones prácticas de este análisis, encontramos que establecer nuevas pautas dietéticas basadas en la disminución de la ingesta elevada de lípidos, acompañada de un menor porcentaje de carbohidratos simples que también están directamente relacionados con la producción de citoquinas proinflamatorias (258), podría ser una estrategia terapéutica para reducir el estado inflamatorio asociado a la fatiga, implicando una mejora motora.

Entre estas citoquinas, nuestro estudio determinó que la IL-6 tenía niveles elevados, coincidiendo con lo publicado por otros autores (259). En cuanto a la relación de IL-6 con las variables antropométricas, existe una correlación positiva con la RCA y el perímetro de cintura, mientras que esto no ocurre con el porcentaje de grasa, la RCC, la circunferencia de cadera y el IMC; lo que parece indicar que la IL-6 se asocia positivamente con la grasa acumulada en la zona abdominal, tal y como han observado otros autores (107). Esto se verifica con niveles significativamente más altos de la interleuquina en pacientes con este tipo de obesidad, lo que también está relacionado con el estado inflamatorio de la enfermedad (93). En este sentido, parece confirmarse el papel fundamental de la IL-6 en el proceso inflamatorio de la patología, lo que está en consonancia con otros resultados que la vinculan con la patogenia de la EM (260). Sin embargo, debemos destacar que, en nuestro estudio, este aumento de IL-6 no se correlaciona con los niveles de PON1. Este resultado indica que la acumulación de grasa, particularmente en el área del abdomen, está relacionada con valores más altos de IL-6, pero no está relacionado con la actividad de PON1 como marcador del estado de oxidación total; por lo que, a pesar de que PON1 es un marcador sensible a las mejoras antropométricas y metabólicas tras el tratamiento nutricional en pacientes con EM (261) y que su actividad antioxidante es baja en la



enfermedad (34), no es un buen marcador del estrés oxidativo asociado a la inflamación para esta enfermedad, coincidiendo con lo observado por otros autores (262).

Cambios antropométricos

La EM es una enfermedad de carácter inflamatorio que se caracteriza por la pérdida progresiva de músculo asociada a un aumento de la grasa (263). En este sentido, se ha demostrado que el antioxidante EGCG reduce la inflamación y el porcentaje de grasa corporal (264). Además, también el incremento de cuerpos cetónicos en sangre se ha relacionado con cambios en la composición corporal caracterizados por pérdida de peso (265) y aumento de la masa muscular; por lo tanto, la pérdida de peso se debe principalmente a la pérdida de grasa (266) junto con una disminución de la inflamación (267).

Coincidiendo con estos resultados, destaca el hecho de que, para nuestros pacientes, tras administrar EGCG junto con aceite de coco (lo que provocó un aumento significativo de β HB en suero), observamos que efectivamente hubo una disminución significativa en el porcentaje de grasa (que en nuestra población estaba dentro de los niveles normales para personas sanas) acompañado de un aumento de la masa muscular, lo que no ocurrió para ninguna de las dos variables en el grupo control de nuestro estudio.

Por otro lado, como ya se ha citado, hubo una disminución significativa en los niveles de citoquina IL-6. Sin embargo, los niveles de IL-6 en sangre también disminuyeron en el grupo de control, lo que podría explicarse por los efectos a nivel microglial de la dieta mediterránea administrada en ambos grupos. Recientemente se ha evidenciado que los oligodendrocitos expuestos a estrés oxidativo *in vitro* tienen el potencial de activar células de la microglía, especialmente por medio de la IL-6, convirtiéndola en protagonista del proceso inflamatorio de la enfermedad (268). IL-6 activa astrocitos y microglía, regulando la expresión de neuropéptidos tras lesión neuronal, para, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas (269). En este sentido, se ha demostrado que seguir una dieta mediterránea disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias producidas en la microglía, y especialmente la IL-6 (270) observada a nivel periférico (271). El efecto antiinflamatorio de esta dieta se debe a su composición, caracterizada por un bajo aporte de grasas saturadas de mantequilla, leche entera y carnes rojas, un alto aporte de grasas monoinsaturadas del aceite de oliva, un adecuado aporte de omega-6 frente a ácidos grasos poliinsaturados omega-3 del pescado, mariscos y frutos secos, bajos contenidos de proteínas obtenidas de la carne roja, altas cantidades de frutas, verduras, aceite de oliva, hierbas



y especias, y altas cantidades de fibra que se encuentran en productos de origen vegetal, como verduras, frutas, cereales integrales, legumbres y frutos secos. Sin embargo, a pesar de que el posible efecto antiinflamatorio de la dieta basal para ambos grupos está determinado por una disminución de IL-6, en nuestro estudio la albúmina solo aumentó en el grupo de intervención. Este resultado podría minimizar el efecto de la dieta, ya que la albúmina se relaciona con la dieta porque es un marcador del estado nutricional, pero también su aumento indica una disminución del estado inflamatorio (272); por lo tanto, los niveles están inversamente correlacionados con marcadores de inflamación como la IL-6 (273).

Butirilcolinesterasa (BuChE)

En cuanto a los cambios antropométricos, posiblemente como consecuencia de mejoras con disminución del porcentaje de grasa en el grupo de intervención, se observó un aumento significativo de la actividad de PON1 en suero (que no se observó en el grupo control), en línea con lo publicado por otros autores tras el tratamiento con antioxidantes (272). Sin embargo, en cuanto a BuChE, a pesar de ser una enzima relacionada con la patogenia de la enfermedad (274,275), se observó un aumento significativo sólo en el grupo de intervención de nuestro estudio. Esto podría basarse en la actividad de la enzima en el metabolismo de los lípidos, como ya observaron otros autores (276). En este sentido, los ratones BuChE KO se vuelven obesos con una dieta rica en grasas (277), BuChE se asocia con los niveles de lipoproteínas en sangre, tomando un papel en su metabolismo y correlacionándolo con sus niveles en patologías, como el síndrome metabólico (278). En este sentido, este papel en el metabolismo de los lípidos podría explicar, por un lado, la correlación positiva con la actividad de PON1 observada tras nuestra intervención, ya que ambas moléculas muestran esta actividad lipolítica (279-280), por otro lado, la correlación positiva con los niveles de grasa en este mismo grupo podría significar que a mayor porcentaje de grasa, mayor actividad de BuChE. Además, también observamos una correlación positiva con los niveles de TG en sangre, como ya se observó en pacientes con riesgo cardíaco (276). El aumento de la actividad de BuChE en nuestro estudio, así como la correlación positiva con estas lipoproteínas, no sería consecuencia de la inflamación derivada de niveles elevados de TG (281), sino de un aumento de TG en sangre a partir del aceite de coco (que contiene altos niveles de TCM), lo que posiblemente refleja un aumento en la actividad lipolítica, que está relacionado con el aumento de cuerpos cetónicos (β HB) observado en los individuos. Por otro lado, los cambios logrados a nivel antropométrico y en los marcadores



séricos también pueden estar correlacionados a nivel central, pues podríamos observar una mejora en la capacidad funcional directamente ligada a la presencia de fatiga asociada, a su vez, a la actividad de BuChE en el SNC (282). Estos resultados podrían confirmar los beneficios clínicos tras mejoras antropométricas que podrían conducir a un aumento de BuChE en sangre, destacando así el papel que tiene esta enzima tanto a nivel central como periférico, como ya sugirieron otros autores (283).

Albúmina-cortisol

La EM se caracteriza por una alteración mitocondrial de las neuronas como resultado de altos niveles de estrés oxidativo relacionado con la obesidad y el deterioro neuromuscular (74) y, al mismo tiempo, con la presencia de depresión cuya hormona principal es el cortisol (284). En este sentido, los pacientes con EM tienen una hiperactividad del eje HPA, con el consiguiente aumento de los niveles de ACTH y cortisol en la sangre (154).

EGCG puede reducir la disfunción del eje HPA (285); y esto podría explicar su impacto en la mejora de los niveles de depresión: en pacientes con síntomas de ansiedad y depresión relacionados con la esquizofrenia o el trastorno bipolar (286), o en modelo animal con esta sintomatología tras administrar la catequina durante 8 semanas (287). Estas mejoras coincidirían con los resultados previamente publicados por nosotros para esta misma población de estudio donde observamos una disminución en la depresión solo en el grupo de intervención (288). Sin embargo, no parece que este cambio se deba a una disminución en los niveles de cortisol total en la sangre, ya que en el grupo control sus niveles siguen siendo similares después del tratamiento. Esto podría deberse al hecho de que, coincidiendo con estos resultados, se ha evidenciado que la administración de EGCG no disminuye los niveles de cortisol en la sangre (289), aunque inhibe 11 β HSD1. Esta enzima es responsable del paso de cortisona a cortisol activo (véase Figura 4), que es la que finalmente se une a su receptor, produciendo el efecto nocivo (290).

Además, es interesante resaltar el papel de la albúmina en la actividad de cortisol libre, ya que, en situaciones de hipoproteinemia, se observan niveles más bajos de transporte de cortisol, lo que aumenta su forma libre a pesar de que sus niveles totales siguen siendo los mismos (291-293). Podría postularse que, en nuestro estudio, el aumento de la albúmina puede conducir a una disminución en las cantidades de cortisol libre que puede unirse a su receptor (GR). Sin embargo, se deben hacer más estudios para confirmar estos mecanismos.



Profundizando en el rol de la albúmina, las altas concentraciones de esta proteína y la disminución de la masa de grasa corporal, podrían estar relacionadas con una disminución de la inflamación. La albúmina es una proteína de fase aguda negativa que disminuye en inflamación (294), y cuyos niveles bajos están asociados con mayores porcentajes de grasa corporal y mayores concentraciones de IL-6 y PCR en la sangre (138). Además, el exceso de masa grasa corporal promueve la inflamación, lo que agrava el pronóstico de la enfermedad y, a su vez, está relacionado con la presencia de depresión en pacientes con EM (159). En este sentido, se ha establecido una relación especialmente significativa entre la depresión y la grasa cuando ésta última se encuentra alrededor del abdomen (295-296). Por lo tanto, la reducción obtenida de la grasa en nuestro estudio, principalmente alrededor del abdomen, podría ayudar a explicar las mejoras en los niveles de depresión en el grupo de intervención, a través de una caída de la inflamación como resultado de mejoras antropométricas.

Debemos destacar que nuestros resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios después de administrar EGCG (297-298). Es importante señalar que existe una relación entre los síntomas emocionales negativos y la EM. En nuestro estudio, los cuerpos cetónicos aumentaron significativamente en el grupo de intervención después de administrar 60 ml diariamente. Las dietas cetogénicas, y especialmente el consumo de aceite de coco, debido a sus altos porcentajes en AGCM que exceden el 50% (200), son, como se ha descrito en el marco teórico, la fuente más importante de cuerpos cetónicos después del metabolismo hepático. Los AGCM tienen un alto nivel de oxidación para obtener energía, evitando así el almacenamiento en el tejido adiposo y promoviendo un mayor uso de energía (299) que conduce a la pérdida de peso sin recuperación a largo plazo (300). Este efecto lipolítico de los cuerpos cetónicos se ha asociado con mejoras en la depresión (301-304) característica de estos pacientes (305).

Haptoglobina (Hp)

Como consecuencia de la mejora significativa de la masa muscular promovida por el tratamiento de EGCG y aceite de coco, nos resultó interesante profundizar, únicamente en el grupo que recibió el tratamiento y que aumentó el músculo, en la función y cambios de la molécula Hp relacionada directamente con la actividad muscular.

El aumento del músculo, cabe señalar que, a pesar de ser significativo, apenas representó un exiguo 1% en comparación con el presentado inicialmente por los pacientes; sin embargo, en nuestro laboratorio, al igual que el incremento que se muestra en la Figura 13, hemos podido



observar una pérdida de aproximadamente -0,59% en el mismo período de tiempo con pacientes con EM que no recibieron ningún tipo de tratamiento (306). Por lo tanto, el aumento observado en nuestro estudio puede ser importante. En este sentido, existen pocos estudios que indiquen una mejora en el porcentaje de masa muscular con intervenciones de la misma naturaleza; con otro tipo de terapias, como la actividad física intensa, se han observado mejoras del 1,5% en 3 meses (307). Por lo tanto, estos resultados podrían confirmar la acción anabólica de β HB al aumentar el músculo observado después de seguir dietas cetogénicas (308), que a su vez podría verse potenciada por la actividad de EGCG como lo describen Kim AR y cols. (2017) quienes demostraron cómo este polifenol aumenta significativamente el tamaño de las fibras musculares, regenerando así el músculo esquelético en situaciones de deterioro muscular (309-310). Además, nuestro estudio vio una disminución considerable en IL-6, lo que posiblemente podría indicar una reducción en los niveles de inflamación tanto del EGCG como del coco (como fuente de β HB en sangre). Estos resultados podrían coincidir con lo ya observado por otros autores al administrar EGCG, ya que este polifenol regula negativamente su expresión génica (311), evidenciándose el efecto de cuerpos cetónicos que disminuyen la síntesis de citoquinas en ratas al bloquear los receptores NMDA (312).

Además, tras nuestra intervención, los niveles de Hp en sangre no variaron. En este sentido, cabe señalar que una hemólisis sostenida en el tiempo, como consecuencia de la progresión de la enfermedad, es capaz de saturar los mecanismos tampón de fr-Hb por Hp, lo que induciría una disminución de sus niveles, facilitando aún más la entrada libre de Hb al SNC a través del BBHE dañado (313), así como una mayor destrucción muscular. Por tanto, el hecho de que los niveles de Hp, tras 4 meses de tratamiento, no hayan disminuido sino que se mantengan, mientras que los porcentajes musculares aumentan significativamente, podría estar asociado a una mejora de la actividad muscular, posiblemente como consecuencia del efecto anabólico a nivel muscular (tanto de EGCG (314) como del aumento de β HB propiciado por la ingesta de aceite de coco (315)), siendo nuestra hipótesis que esta mejora podría estar mediada a su vez por la neutralización de Hb libre. En consecuencia, este patrón en la secreción de la proteína podría estar asociado a su efecto antiinflamatorio, como ya se ha observado en otras enfermedades, ya que promueve la unión de Hb-Hp, inhibiendo así la peroxidación lipídica estimulada por Hb y reduciendo la oxidación (316). Además, esto no solo se considera actividad antiinflamatoria, sino también actividad inmunomoduladora al regular los mediadores proinflamatorios (317). Este hecho hace que la actividad de Hp adquiera especial relevancia en términos de enfermedades autoinmunes. En particular, en modelos animales de EM, al inhibir



la síntesis de Hp (EAE Hp knockout), se observó que la enfermedad era mucho más grave, lo que indica que los niveles de Hp en sangre tienen un papel destacado en la progresión de enfermedades autoinmunes, y específicamente en MS (318), que nuestros resultados pueden confirmar.

Por otro lado, también se analizaron posibles correlaciones de la proteína Hp. Al realizar esta valoración, antes de la intervención la proteína muestra una correlación positiva con la secreción de IL-6, lo que demuestra que en las condiciones características de la EM de alta inflamación y destrucción muscular (como se evidencia en nuestro estudio con niveles muy por encima de la normalidad de IL-6), cuanto mayor sea la secreción de IL-6, mayor será la expresión de Hp en sangre (también muy por encima de los valores normales). Estos resultados coinciden con los publicados en modelos animales de ratas diabéticas que presentaban alto estrés oxidativo e inflamación como consecuencia de la enfermedad, y donde también se registró una correlación positiva entre ambas moléculas (319). Sin embargo, a pesar de las mejoras en los niveles inflamatorios determinadas por una disminución significativa de IL-6 después del tratamiento, esta correlación positiva se mantiene. Esto se explicaría por el propio mecanismo en la expresión de Hp, que también depende precisamente de la secreción de citoquinas (320).

A pesar de esta correlación positiva entre IL-6 y Hp tanto antes como después de 4 meses de tratamiento, la correlación entre secreción de Hp y porcentaje muscular se invierte antes de la intervención (correlación negativa); por lo tanto, no se registra ningún tipo de relación posterior al tratamiento. Estos resultados podrían aportar información sobre el hecho de que antes de la mejora muscular, la actividad de la proteína Hp estaría relacionada con la destrucción muscular, tal y como indican otros autores (321). Sin embargo, y como se ha comentado anteriormente, al mejorar el porcentaje muscular usando Hp para neutralizar la Hb libre al disminuir la hemólisis, no existe correlación. Esto podría indicar que los niveles de Hp libre en sangre están relacionados con la destrucción muscular como consecuencia de la inflamación, pero no con la oxigenación asociada a la recuperación muscular. Tras analizar y debatir todos nuestros resultados, las actividades de EGCG y β HB relacionadas con las variables analizadas, nos permiten identificar a la molécula Hp como un biomarcador tanto de procesos inflamatorios ligados a la destrucción muscular, como de mejora muscular tras algún tipo de intervención terapéutica de tipo anabólico y naturaleza antiinflamatoria.

5.2. Cambios en el perfil lipídico en pacientes con esclerosis múltiple (EM), tras tratamiento con epigallocatequina galato (EGCG) y aceite de coco (OS 2)



A la hora de valorar y discutir los resultados relacionados con este objetivo, resulta importante recordar que todos los participantes del estudio (grupo control y grupo intervención) recibieron de base una dieta mediterránea adaptada a las necesidades de cada paciente, que incluyó fuentes proteicas, carbohidratos de bajo índice glucémico y verduras ricas en fibra; eliminando por completo ultra procesados, azúcares simples y carbohidratos de alto índice glucémico (pues un metabolismo glucémico disfuncional, produce un daño mitocondrial que a su vez aumenta el avance de la enfermedad por la atrofia axonal que produce la disminución de ATP).

Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, solo se produjo diferencias entre grupo intervención y placebo tras los 4 meses de intervención, en los niveles de TG. Este resultado puede discernir las dudas especialmente de la actividad del aceite de coco rico en grasas. Este nutriente, se eligió como tratamiento para nuestra población por evidencias previas que lo identifican como uno de los neuroprotectores más eficaces frente a la inflamación y el elevado estrés oxidativo, lo que se basa en la actividad conocida desde hace muchos años de los cuerpos cetónicos originados por el metabolismo hepático, entre los que destacan los β HB (319). Estos metabolitos mejoran la actividad mitocondrial, al representar una vía energética alternativa para las neuronas (320), por lo que suponen a día de hoy una muy buena alternativa al tratamiento farmacológico de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (321). Esta mejora en la actividad mitocondrial puede deberse a que el aceite de coco se ha relacionado directamente con una reducción del tamaño de los adipocitos en los tejidos adiposos blancos, lo que hace que se le vincule con una actividad eficaz en la mejora de la disfunción del metabolismo lipídico (322). Este rol del aceite de coco puede explicar a su vez, su eficacia en la mejora de un cuadro de dislipemia, ya que su administración: aumenta los niveles de HDL, y reduce los triacilgliceroles hepáticos en modelo animal (323). Estos resultados coinciden con lo observado en nuestro estudio, donde se produce un incremento en el CT en ambos grupos (intervención y control); consecuencia fundamentalmente de: un ligero incremento de LDL y APOA1 no significativos, y un aumento en el HDL que fue mayor en los pacientes del grupo control.

La única diferencia en la tendencia del cambio entre grupo intervención y grupo control, fue precisamente en los niveles de TG, ya que en el grupo intervención disminuyen significativamente respecto a sus valores iniciales, mientras que en el grupo placebo se produjo un efecto contrario, mostrando un incremento significativo; lo que justifica a su vez la eficacia ya evidenciada, tanto del aceite de coco como de EGCG, en la disminución de los niveles de los TG en sangre (324-325).



En este sentido, cabe recordar que la disminución de la capacidad funcional (uno de los aspectos clínicos que más disminuyen la calidad de vida de estos pacientes), está relacionada con los cambios antropométricos. Vinculados con esos cambios antropométricos, caracterizados por un incremento en los porcentajes de la grasa corporal (105), podrían estar precisamente los niveles de TG en sangre, que son proinflamatorios y se asocian con mayor grado de oxidación celular y de afectación energética a nivel de la mitocondria (56). En nuestra población, los niveles de TG en sangre no se muestran especialmente altos (estando dentro de la normalidad (30.0160.0mg/dl)); pero la disminución significativa tras los 4 meses que duró la intervención, únicamente en el grupo intervención, podría explicar a su vez la mejora en la capacidad funcional en el grupo intervención (determinada mediante la escala EDSS), ya que ésta se correlaciona significativamente y de modo positivo con los niveles de TG únicamente en el grupo intervención. A lo que hay que añadir que, a su vez, la capacidad funcional se correlaciona del mismo modo positiva y significativamente en el grupo intervención, con un marcador de inflamación como es los niveles de PCR en sangre. Esto podría confirmar que los cambios que se dan en ambas moléculas (TG y PCR) dependen, en el caso del grupo intervención, de las mejoras que se dan a su vez en la capacidad funcional tras administración de EGCG y aceite de coco vinculados a su vez a mejoras antropométricas (188, 189, 326-327).

Finalmente, cabe destacar que esta actividad beneficiosa de nuestro tratamiento con aceite de coco, es contraria a la que se produce con otras dietas que también son ricas en grasa, pero de otra naturaleza, ya que éstas se relacionan por ejemplo con exacerbación de los efectos de las placas amiloides en la enfermedad de Alzheimer, mientras que la dieta rica en aceite de coco muestra un efecto neuroprotector potencial (328). Este efecto neuroprotector, podría ser debido en parte también a la gran cantidad de polifenoles que presenta el aceite de coco, que una vez aislados se ha visto como previenen las anomalías lipídicas inducidas por el cadmio y los índices de riesgo cardiovascular al mejorar los sistemas de defensa antioxidantes (329). Este hecho, justificaría que la intervención de nuestro estudio se completara con otro polifenol, y concretamente EGCG. EGCG actúa protegiendo la peroxidación lipídica con función antiinflamatoria y antioxidante, lo que ejerce un papel neuroprotector; este rol es especialmente interesante como complemento del aceite de coco, porque este polifenol se ha visto como precisamente aumenta las concentraciones de ácidos grasos libres en plasma, lo que sugiere un mayor uso de lípidos como fuente de energía, mejorando funciones como la resistencia física (330); o el estado cardiovascular. En este sentido, cabe destacar cómo los polifenoles se caracterizan por sus efectos vasodilatadores, muestran efectos antiinflamatorios claros y pueden



modular las vías apoptóticas en el endotelio vascular, lo que se completa con la mejora del perfil lipídico todo lo cual promueve las mejoras cardíacas (331).

5.3. Impacto de la intervención de epigallocatequina galato (EGCG) y aceite de coco en el riesgo cardíaco (OS 3)

Clínicamente, uno de los problemas más importantes que presentan los pacientes con EM es el elevado riesgo cardíaco que presentan, y que se debe fundamentalmente al exceso de grasa abdominal (322-333) observada también en la muestra poblacional de esta tesis doctoral, y a la pérdida de masa muscular (334). Estos cambios antropométricos están vinculados directamente con comorbilidades de naturaleza cardíacas (335). Por lo tanto, uno de los objetivos de la tesis fue precisamente, como consecuencia o relacionado con las mejoras en el perfil antropométrico y lipídico analizadas anteriormente, el de mejorar este riesgo cardíaco a través del tratamiento con altas cantidades de EGCG complementado con aceite de coco (336) y con una base de dieta mediterránea. Como consecuencia del tratamiento, se pudo observar que efectivamente se obtuvo una mejora significativa en el riesgo cardíaco en el grupo que recibió este tratamiento, ya que aumentaron los porcentajes de pacientes con riesgo moderado o menor. Esto consolida que este tipo de dieta podría permitir reducir la probabilidad de enfermedad coronaria ya descrito (337). El papel del EGCG en esta mejoría cardíaca, se basaría en que, tal como se describe en el marco teórico, este polifenol protege frente a la peroxidación lipídica (338); además, presenta actividad antiinflamatoria y antioxidante, todo lo cual hace que su administración se asocie a un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares (339).

En este sentido, cabe destacar que la reducción del riesgo cardíaco se vincula principalmente con la pérdida de la grasa abdominal. La EGCG muestra grandes propiedades antiobesidad, lo que se basa en su capacidad para disminuir la proliferación de adipocitos, la lipogénesis y la síntesis de adipoquinas proinflamatorias (340) especialmente a nivel abdominal (341), mejorando de este modo, las variables que hemos determinado (342). Por otra parte, y en la misma línea, los cuerpos cetónicos, en condiciones isoenergéticas se muestran eficaces en la mejora de la tasa metabólica basal (343) y reducen el apetito vinculado al efecto saciante que presentan. Sin embargo, cabe destacar que esta actividad se muestra moderada en humanos, y como consecuencia, el peso se pierde se relaciona directamente con la pérdida de grasa (344). Además, hay que destacar que el riesgo cardíaco no solo depende de la grasa corporal, sino también de la pérdida de masa muscular (345-346). Y en este aspecto, EGCG ha evidenciado una actividad protectora y reparadora del músculo esquelético (347); y también cabe destacar



cómo tras la administración de dieta cetogénica se han obtenido mejoras musculares (348). Nuestros resultados respaldan estos hallazgos, ya que la intervención de nuestro estudio consiguió, únicamente en el grupo intervención, un incremento en la masa muscular. La eficacia de la intervención a nivel antropométrico parece confirmarse específicamente por las variables: porcentaje de grasa, RCA y porcentaje muscular, tras aplicar el test ANOVA que asocia el efecto de la duración de la intervención con el propio tratamiento.

Esta disminución del riesgo cardíaco asociada a mejoras antropométricas también se ha evidenciado a nivel bioquímico. La acumulación de grasa abdominal contribuye directamente al estado inflamatorio crónico de la enfermedad (349), aumentando la concentración de moléculas proinflamatorias relacionadas con el estado de oxidación y el riesgo cardíaco. En particular, en esta tesis, y para valorar las mejoras cardíacas del tratamiento relacionadas con el tercer objetivo secundario, valoramos de nuevo los cambios en los niveles de albúmina, actividad de la PON1 y PCR, antes y después de la intervención.

La albúmina se ha correlacionado negativamente con el desarrollo de la EM, teniendo incluso una relación más pronunciada a medida que avanza la enfermedad (349). En nuestro caso, como ya se ha dicho se observó un aumento significativo solo en los pacientes tratados, lo que demostró que nuestra intervención con EGCG y aceite de coco aumentó la concentración de esta proteína. Este efecto es beneficioso para el corazón, ya que bajas concentraciones de albúmina se asocian con enfermedad arterial coronaria o insuficiencia cardíaca (350), y la hipoalbuminemia se considera un factor de riesgo cardiovascular (143). Además, un aumento en los niveles de albúmina podría potenciar los efectos del EGCG en nuestro tratamiento, ya que se ha demostrado que la albúmina se une al EGCG estabilizando este polifenol y potenciando su poder antioxidante (351-352).

También obtuvimos un aumento igualmente significativo de la actividad de PON1, en línea con lo publicado por otros autores que, por un lado, vieron un aumento significativo de la actividad de la paraoxonasa al administrar polifenol resveratrol en ratones con aterosclerosis (ApoE-ratones deficientes) (351) y, por otro lado, la administración de catequinas en humanos aumentó significativamente la PON1 en suero, provocando una disminución de las citoquinas proinflamatorias. En ratas, al seguir una dieta enriquecida con aceite de coco, hubo un aumento significativo en la actividad de PON1, a diferencia de lo que sucedió cuando siguieron una dieta enriquecida con otros aceites, como aceite de copra, aceite de oliva y aceite de girasol (353). Finalmente, la PCR, que está relacionada con el desarrollo de la EM (105), como ya se vio anteriormente no disminuyó después de la intervención. Se podría esperar que la administración



de aceite de coco aumentara la PCR, como se ha descrito anteriormente (354); sin embargo, tras la intervención de nuestro estudio, los valores no aumentaron, sino que se mantuvieron en niveles similares, lo que podría deberse al efecto compensador de la EGCG, cuya actividad disminuye la secreción de PCR (355).

Todos los cambios bioquímicos positivos obtenidos únicamente en el grupo intervención también se observan tras aplicar el test ANOVA para albúmina y PON1 (cuya actividad incluso empeora en el grupo control), lo que parece confirmar la eficacia del tratamiento, y especialmente a nivel cardíaco.

Tras la discusión de nuestros resultados, cabe destacar que nuestro estudio presenta claras limitaciones. Entre estas cabe destacar que la muestra poblacional es pequeña, e incluye únicamente pacientes de la Comunidad Valenciana. Por otro lado, pensamos que se deben realizar estudios complementarios que profundicen sobre la mejora en la actividad mitocondrial a nivel energético. También sería de interés la valoración de otros marcadores relacionados con el estado de inflamación, que no se han tenido en cuenta en este estudio, como el TNF y la citoquina antiinflamatoria IL-10. Además, la valoración de estos marcadores, es interesante que se realice, no únicamente justo antes y después del estudio, sino también durante la intervención (tratando así de profundizar en la actividad a nivel metabólico del tratamiento) y durante los meses posteriores al término de la intervención para comprobar la durabilidad del efecto de las moléculas empleadas.

Por otra parte, sería interesante determinar, no solo el impacto de la intervención a un nivel periférico, sino también en términos del SNC, con la intención de establecer por ejemplo la relación de BuChE (determinada en nuestro estudio) con Ach o el proceso de remielinización que se ha observado recientemente después de seguir una dieta cetogénica.

Finalmente, cabe destacar que el riesgo cardíaco se ha determinado a partir de variables únicamente antropométricas, y en base a marcadores que están relacionados con la actividad del sistema cardiocirculatorio, pero sería muy interesante completar estos resultados con pruebas de imagen y de funcionalidad cardíaca que analicen la actividad del SN simpático y parasimpático, ayudando a entender todavía más nuestros resultados. Es por esto que proponemos futuras líneas de investigación que se centren en estos parámetros, empleando para ello una población mayor de pacientes con la enfermedad.

A pesar de estas limitaciones, teniendo en cuenta que los efectos secundarios de los medicamentos utilizados para tratar a este tipo de paciente pueden producir numerosos efectos negativos, y viendo que se consiguen numerosas mejoras (no solamente clínicas sino también



bioquímicas), sugerimos que el desarrollo de tratamientos no farmacológicos basados en terapias alternativas como la administración de antioxidantes y neuroprotectores a partir de fuentes nutricionales, puede resultar una alternativa muy positiva. Poder conocer el impacto beneficioso de esta alternativa terapéutica, y comprender cómo logran estas mejoras como hemos tratado de hacer en nuestro trabajo, nos permitirá avanzar el conocimiento de la enfermedad, mejorando la calidad de vida de estos pacientes.



CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES

Tras el análisis y discusión de los resultados, obtenidos en respuesta a los objetivos planteados y a partir de la hipótesis de partida, las conclusiones del estudio son las siguientes:

- I. La intervención de EGCG y aceite de coco en pacientes con EM disminuye el estado de inflamación característico de la enfermedad, lo que explica a su vez una mejora en la función cardíaca del tratamiento.
- II. Los pacientes del estudio presentan *obesidad abdominal*, a consecuencia de los malos hábitos nutricionales, asociada a los altos valores de la *IL-6* como marcador de inflamación, que, sin embargo, no se correlaciona con una actividad más baja del marcador de oxidación PON1.

La administración en estos pacientes de EGCG junto con un aumento de cuerpos cetónicos en la sangre después de la ingesta de aceite de coco, provoca mejoras antropométricas caracterizadas por una disminución de la grasa corporal e incremento de la masa muscular. En cuanto al rol de determinadas moléculas en estos cambios, la enzima *BuChE* parece tener un papel en el aumento de la actividad lipolítica; ya que sus niveles aumentan después del tratamiento y, al mismo tiempo, se correlacionan positivamente con el porcentaje de grasa, los niveles de TG en sangre y la actividad de PON1.

También la combinación de EGCG y aceite de coco se asoció con un aumento de la *albúmina* en la sangre sin que cambiaran los niveles de *cortisol*, y una disminución de la *grasa abdominal*; para pacientes que mostraron menor depresión que al inicio.

En cuanto a *Hp*, se ha evidenciado una relación entre sus niveles y la actividad anabólica del tratamiento. En este sentido, su cuantificación en sangre representa una herramienta diagnóstica para pacientes con EM, tanto con respecto al daño muscular como a la



regeneración muscular asociada con una inflamación más baja consecuencia del tratamiento.

- III. Los pacientes con EM del estudio presentan unos valores discretamente superiores para CT y LDL. Sin embargo, tras los 4 meses de duración del estudio, todos muestran las mismas tendencias en el cambio, con incrementos en CT, HDL, LDL y APOA-1; a excepción del nivel de TG, que solamente se logra que disminuya tras la intervención con EGCG y aceite de coco, aumentando en el grupo que no lo reciben, y estando esta disminución relacionada con la mejora funcional y con la disminución de inflamación representada por la concentración de la PCR en sangre.
- IV. La administración del antioxidante EGCG y aceite de coco disminuye el riesgo cardíaco en pacientes con EM. Esta disminución se determina como resultado de la mejora de dos variables diferentes: antropométricas con reducción en RCC y aumento en el porcentaje muscular; y de analitos séricos, con aumento de la actividad de PON1 y de los niveles *albúmina* en la sangre.

Estas conclusiones, parecen confirmar tanto la hipótesis principal planteada en la tesis, como las hipótesis secundarias.

Universidad Católica de Valencia “San Vicente Mártir”

CAPÍTULO VII

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Golriz Khatami S, Mubeen S, Hofmann-Apitius M. Data science in neurodegenerative disease: its capabilities, limitations, and perspectives. *Curr Opin Neurol.* 2020;33(2):249-54.
2. Muddapu VR, Dharshini SAP, Chakravarthy VS, Gromiha MM. Neurodegenerative Diseases - Is Metabolic Deficiency the Root Cause? *Front Neurosci.* 2020;14:213.



3. Kiaei M. New hopes and challenges for treatment of neurodegenerative disorders: great opportunities for young neuroscientists. *Basic Clin Neurosci.* 2013;4(1):3-4.
4. Gan L, Cookson MR, Petrucelli L, La Spada AR. Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nat Neurosci.* 2018;21(10):1300-9.
5. Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules.* 2018;23(4).
6. Introducción a la historia de la esclerosis múltiple. *Acta Neurol Colomb.* [Internet]. 2015 Jan [cited 2022 Apr 24]; 31(1): 119-124. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012087482015000100017&lng=en.
7. Rolak LA. MS: the basic facts. *Clin Med Res.* 2003;1(1):61-2.
8. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007;8(9):913-9.
9. Constantinescu CS, Gran B. Multiple sclerosis: autoimmune associations in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2010;6(11):591-2.
10. Kutzelnigg A, Lassmann H. Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Handb Clin Neurol.* 2014; 122:15-58.
11. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(3).
12. Bauer J, Gold R, Adams O, Lassmann H. Progressive multifocal leukoencephalopathy and immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). *Acta Neuropathol.* 2015;130(6):751-64.
13. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology.* 2014;83(11):1022-4.



14. Zhang GX, Carrillo-Vico A, Zhang WT, Gao SS, Izquierdo Ayuso G. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in China and other Asian countries. *Neurologia (Engl Ed)*. 2020.
15. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*. 2020;26(14):1816-21.
16. Perez-Carmona N, Fernandez-Jover E, Sempere AP. Epidemiology of multiple sclerosis in Spain. *Rev Neurol*. 2019;69(1):32-8.
17. Klineova S, Lublin FD. Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(9).
18. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol*. 2012;11(2):157-69.
19. Lublin FD, Baier M, Cutter G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. *Neurology*. 2003;61(11):1528-32.
20. Ransohoff RM, Hafler DA, Lucchinetti CF. Multiple sclerosis-a quiet revolution. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(3):134-42.
21. Weiner HL. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2008;255 Suppl 1:3-11.
22. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2018;391(10130):1622-36.
23. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One*. 2010;5(9).
24. Alfredsson L, Olsson T. Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(4).
25. Robinson WH, Steinman L. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Science*. 2022;375(6578):264-5.



26. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(3):690-3.
27. Lucas RM, Byrne SN, Correale J, Ilschner S, Hart PH. Ultraviolet radiation, vitamin D and multiple sclerosis. *Neurodegener Dis Manag.* 2015;5(5):413-24.
28. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA.* 2006;296(23):2832-8.
29. Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Fatty fish intake is associated with decreased occurrence of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014;20(6):726-32.
30. Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(9).
31. Kohen R, Beit-Yannai E, Berry EM, Tirosh O. Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. *Methods Enzymol.* 1999;300:285-96.
32. Matschke V, Theiss C, Matschke J. Oxidative stress: the lowest common denominator of multiple diseases. *Neural Regen Res.* 2019;14(2):238-41.
33. Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017;360(1):201-5.
34. Castellazzi M, Trentini A, Romani A, Valacchi G, Bellini T, Bonaccorsi G, et al. Decreased arylesterase activity of paraoxonase-1 (PON-1) might be a common denominator of neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;81(Pt B):356-63.
35. Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, et al. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain.* 2012;135(Pt 3):886-99.
36. Ohl K, Tenbrock K, Kipp M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Exp Neurol.* 2016;277:58-67.
37. Barcelos IP, Troxell RM, Graves JS. Mitochondrial Dysfunction and Multiple Sclerosis. *Biology (Basel).* 2019;8(2).
38. Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science.* 2004;304(5668):253-7.



39. Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 2006;59(3):478-89.
40. Mammana S, Fagone P, Cavalli E, Basile MS, Petralia MC, Nicoletti F, et al. The Role of Macrophages in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Pathways of Alzheimer's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis: Pathogenetic Cellular Effectors and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
41. Machado-Santos J, Saji E, Troscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8⁺ T lymphocytes and B cells. *Brain.* 2018;141(7):2066-82.
42. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009;132(Pt 5):1175-89.
43. Ponath G, Park C, Pitt D. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2018;9:217.
44. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(11):647-56.
45. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 2012;26(3):203-34.
46. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374(Pt 1):1-20.
47. Bravo J, Heath JK. Receptor recognition by gp130 cytokines. *EMBO J.* 2000;19(11):2399-411.
48. Stelmasiak Z, Koziol-Montewka M, Dobosz B, Rejdak K, Bartosik-Psujek H, MitosekSzewczyk K, et al. Interleukin-6 concentration in serum and



- cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients. *Med Sci Monit.* 2000;6(6):1104-8.
49. Drehmer E, Platero JL, Carrera-Julia S, Moreno ML, Tvarijonaviciute A, Navarro MA, et al. The Relation between Eating Habits and Abdominal Fat, Anthropometry, PON1 and IL-6 Levels in Patients with Multiple Sclerosis. *Nutrients.* 2020;12(3).
50. Ford H. Clinical presentation and diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Med (Lond).* 2020;20(4):380-3.
51. Freiha J, Riachi N, Chalah MA, Zoghaib R, Ayache SS, Ahdab R. Paroxysmal Symptoms in Multiple Sclerosis-A Review of the Literature. *J Clin Med.* 2020;9(10).
52. Winder K, Linker RA, Seifert F, Wang R, Lee DH, Engelhorn T, Dörfler A, Fröhlich K, Hilz M. Cerebral lesion correlates of sympathetic cardiovascular activation in multiple sclerosis. *Hum Brain Mapp.* 2019 Dec 1;40(17):5083-5093.
53. Stampanoni Bassi M, Iezzi E, Buttari F, Gilio L, Simonelli I, Carbone F, et al. Obesity worsens central inflammation and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2020;26(10):1237-46.
54. de Candia P, Matarese G. Leptin and ghrelin: Sewing metabolism onto neurodegeneration. *Neuropharmacology.* 2018;136(Pt B):307-16.
55. De Rosa V, La Cava A, Matarese G. Metabolic pressure and the breach of immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2017;18(11):1190-6.
56. Gafson AR, Thorne T, McKechnie CIJ, Jimenez B, Nicholas R, Matthews PM. Lipoprotein markers associated with disability from multiple sclerosis. *Sci Rep.* 2018;8(1):17026.
57. Sicras-Mainar A, Ruiz-Beato E, Navarro-Artieda R, Maurino J. Comorbidity and metabolic syndrome in patients with multiple sclerosis from Asturias and Catalonia, Spain. *BMC Neurol.* 2017;17(1):134.
58. Wens I, Dalgas U, Stenager E, Eijnde BO. Risk factors related to cardiovascular diseases and the metabolic syndrome in multiple sclerosis - a systematic review. *Mult Scler.* 2013;19(12):1556-64.



59. Tettey P, Simpson S, Jr., Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Dwyer T, et al. An adverse lipid profile is associated with disability and progression in disability, in people with MS. *Mult Scler.* 2014;20(13):1737-44.
60. Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Mahfooz N, Carl E, Drake A, Schneider J, et al. Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2011;8:127.
61. Jorissen W, Wouters E, Bogie JF, Vanmierlo T, Noben JP, Sviridov D, et al. Relapsing-remitting multiple sclerosis patients display an altered lipoprotein profile with dysfunctional HDL. *Sci Rep.* 2017;7:43410.
62. Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clin Nutr.* 2005;24(1):16-31.
63. Goldbourt U, Yaari S, Medalie JH. Isolated low HDL cholesterol as a risk factor for coronary heart disease mortality. A 21-year follow-up of 8000 men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(1):107-13.
64. Mailleux J, Timmermans S, Nelissen K, Vanmol J, Vanmierlo T, van Horssen J, et al. Low-Density Lipoprotein Receptor Deficiency Attenuates Neuroinflammation through the Induction of Apolipoprotein E. *Front Immunol.* 2017;8:1701.
65. Matsuzawa Y, Lerman A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment. *Coron Artery Dis.* 2014;25(8):713-24.
66. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol.* 2006;5:4.
67. Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, Saini V, Sharma A, Saini RV, et al. Mechanistic Insights into the Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:5245308.
68. Sandesara PB, Virani SS, Fazio S, Shapiro MD. The Forgotten Lipids: Triglycerides, Remnant Cholesterol, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk. *Endocr Rev.* 2019;40(2):537-57.



69. Alexopoulos AS, Qamar A, Hutchins K, Crowley MJ, Batch BC, Guyton JR. Triglycerides: Emerging Targets in Diabetes Care? Review of Moderate Hypertriglyceridemia in Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2019;19(4):13.
70. Toth PP. Triglyceride-rich lipoproteins as a causal factor for cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2016;12:171-83.
71. Olufadi R, Byrne CD. Effects of VLDL and remnant particles on platelets. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2006;35(3-4):281-91.
72. Babic Z, Zeljkovic I, Pintaric H, Vrsalovic M, Jelavic MM, Misigoj-Durakovic M. The Role of Anthropometric Parameters and Physical Activity Level in Patients with Acute Coronary Syndrome Admitted to the Intensive Cardiac Care Unit. *Acta Clin Croat.* 2021;60(2):201-8.
73. Gilani N, Kazemnejad A, Zayeri F, Hadaegh F, Azizi F, Khalili D. Anthropometric Indices as Predictors of Coronary Heart Disease Risk: Joint Modeling of Longitudinal Measurements and Time to Event. *Iran J Public Health.* 2017;46(11):1546-54.
74. Wens I, Dalgas U, Vandenabeele F, Krekels M, Grevendonk L, Eijnde BO. Multiple sclerosis affects skeletal muscle characteristics. *PLoS One.* 2014;9(9):e108158.
75. Kent-Braun JA, Ng AV, Castro M, Weiner MW, Gelinas D, Dudley GA, et al. Strength, skeletal muscle composition, and enzyme activity in multiple sclerosis. *J Appl Physiol (1985).* 1997;83(6):1998-2004.
76. Garner DJ, Widrick JJ. Cross-bridge mechanisms of muscle weakness in multiple sclerosis. *Muscle Nerve.* 2003;27(4):456-64.
77. Carroll CC, Gallagher PM, Seidle ME, Trappe SW. Skeletal muscle characteristics of people with multiple sclerosis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005;86(2):224-9.
78. de Haan A, de Ruiter CJ, van Der Woude LH, Jongen PJ. Contractile properties and fatigue of quadriceps muscles in multiple sclerosis. *Muscle Nerve.* 2000;23(10):1534-41.



79. Salvatore A, Cigliano L, Carlucci A, Bucci EM, Abrescia P. Haptoglobin binds apolipoprotein E and influences cholesterol esterification in the cerebrospinal fluid. *J Neurochem.* 2009;110(1):255-63.
80. Quaye IK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(8):735-42.
81. Chiellini C, Bertacca A, Novelli SE, Gorgun CZ, Ciccarone A, Giordano A, et al. Obesity modulates the expression of haptoglobin in the white adipose tissue via TNFalpha. *J Cell Physiol.* 2002;190(2):251-8.
82. Lewin A, Hamilton S, Witkover A, Langford P, Nicholas R, Chataway J, et al. Free serum haemoglobin is associated with brain atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. *Wellcome Open Res.* 2016;1:10.
83. Ferguson SK, Redinius K, Yalamanoglu A, Harral JW, Hyen Baek J, Pak D, et al. Effects of living at moderate altitude on pulmonary vascular function and exercise capacity in mice with sickle cell anaemia. *J Physiol.* 2019;597(4):1073-85.
84. Salvatore A, Cigliano L, Bucci EM, Corpillo D, Velasco S, Carlucci A, et al. Haptoglobin binding to apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the enzyme lecithin-cholesterol acyltransferase. *Biochemistry.* 2007;46(39):11158-68.
85. Murphy S, Dowling P, Zweyer M, Henry M, Meleady P, Mundegar RR, et al. Proteomic profiling of mdx-4cv serum reveals highly elevated levels of the inflammation-induced plasma marker haptoglobin in muscular dystrophy. *Int J Mol Med.* 2017;39(6):1357-70.
86. Buendia JA, Zuluaga AF. [Physicians insight about adverse drug reaction to frequently used medication groups in Bogota (Colombia)]. *Biomedica.* 2014;34(3):403-8.
87. Levy AP. Application of pharmacogenomics in the prevention of diabetic cardiovascular disease: mechanistic basis and clinical evidence for utilization of the haptoglobin genotype in determining benefit from antioxidant therapy. *Pharmacol Ther.* 2006;112(2):501-12.



88. Guo L, Akahori H, Harari E, Smith SL, Polavarapu R, Karmali V, et al. CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2018;128(3):1106-24.
89. Luan YY, Yao YM. The Clinical Significance and Potential Role of C-Reactive Protein in Chronic Inflammatory and Neurodegenerative Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:1302.
90. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol*. 2018;9:754.
91. Bisoendial RJ, Kastelein JJ, Levels JH, Zwaginga JJ, van den Bogaard B, Reitsma PH, et al. Activation of inflammation and coagulation after infusion of C-reactive protein in humans. *Circ Res*. 2005;96(7):714-6.
92. Elliott P, Chambers JC, Zhang W, Clarke R, Hopewell JC, Peden JF, et al. Genetic Loci associated with C-reactive protein levels and risk of coronary heart disease. *JAMA*. 2009;302(1):37-48.
93. Heber D. An integrative view of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(1):280S-3S.
94. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005;46(11):2347-55.
95. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.
96. Kamerling SG, Wettstein JG, Sloan JW, Su TP, Martin WR. Interaction between nicotine and endogenous opioid mechanisms in the unanesthetized dog. *Pharmacol Biochem Behav*. 1982;17(4):733-40.
97. Rittmaster RS, Abbott EC, Douglas R, Givner ML, Lehmann L, Reddy S, et al. Effect of methimazole, with or without L-thyroxine, on remission rates in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(3):814-8.
98. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(5):1313-6.



99. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA*. 1999;282(22):2131-5.
100. Weyer C, Yudkin JS, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Pratley RE, Tataranni PA. Humoral markers of inflammation and endothelial dysfunction in relation to adiposity and in vivo insulin action in Pima Indians. *Atherosclerosis*. 2002;161(1):233-42.
101. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821-30.
102. Clement K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J*. 2004;18(14):1657-69.
103. Tansey JT, Sztalryd C, Hlavin EM, Kimmel AR, Londos C. The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life*. 2004;56(7):379-
- 85.
104. Demir S. Multiple Sclerosis Functional Composite. *Noro Psikiyatrs Ars*. 2018;55(Suppl 1):S66-S8.
105. Baynard T, Hilgenkamp TIM, Schroeder EC, Motl RW, Fernhall B. Measures of adiposity differentially correlate with C-reactive protein among persons with multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2018;25:1-4.
106. Vella CA, Nelson MC, Unkart JT, Miljkovic I, Allison MA. Skeletal muscle area and density are associated with lipid and lipoprotein cholesterol levels: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Clin Lipidol*. 2020;14(1):143-53.
107. Bawadi H, Katkhouda R, Tayyem R, Kerkadi A, Bou Raad S, Subih H. Abdominal Fat Is Directly Associated With Inflammation In Persons With Type-2 Diabetes Regardless Of Glycemic Control - A Jordanian Study. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019;12:2411-7.



108. Reichert CO, de Macedo CG, Levy D, Sini BC, Monteiro AM, Gidlund M, et al. Paraoxonases (PON) 1, 2, and 3 Polymorphisms and PON-1 Activities in Patients with Sickle Cell Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(8).
109. Reichert CO, Levy D, Bydlowski SP. Paraoxonase Role in Human Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2020;10(1).
110. Menini T, Gugliucci A. Paraoxonase 1 in neurological disorders. *Redox Rep*. 2014;19(2):49-58.
111. Costa LG, Giordano G, Furlong CE. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(3):337-44.
112. Tisato V, Romani A, Tavanti E, Melloni E, Milani D, Bonaccorsi G, et al. Crosstalk Between Adipokines and Paraoxonase 1: A New Potential Axis Linking Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(8).
113. Razzak M. Haematological Cancer: Allogeneic stem-cell transplantation resolving questions of timing, remission and the individual. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(4):181.
114. Hadamitzky M, Engler H, Schedlowski M. Learned immunosuppression: extinction, renewal, and the challenge of reconsolidation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(1):180-8.
115. Grando SA, Pittelkow MR, Schallreuter KU. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol*. 2006;126(9):1948-65.
116. Cox MA, Bassi C, Saunders ME, Nechanitzky R, Morgado-Palacin I, Zheng C, et al. Beyond neurotransmission: acetylcholine in immunity and inflammation. *J Intern Med*. 2020;287(2):120-33.
117. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci*. 2017;134(1):1-21.



118. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000;405(6785):458-62.
119. Carnevale D, Perrotta M, Pallante F, Fardella V, Iacobucci R, Fardella S, et al. A cholinergic-sympathetic pathway primes immunity in hypertension and mediates brain-to-spleen communication. *Nat Commun*. 2016;7:13035.
120. Darvesh S, Leblanc AM, Macdonald IR, Reid GA, Bhan V, Macaulay RJ, et al. Butyrylcholinesterase activity in multiple sclerosis neuropathology. *Chem Biol Interact*. 2010;187(1-3):425-31.
121. Pottie IR, Higgins EA, Blackman RA, Macdonald IR, Martin E, Darvesh S. Cysteine thioesters as myelin proteolipid protein analogues to examine the role of butyrylcholinesterase in myelin decompaction. *ACS Chem Neurosci*. 2011;2(3):151-9.
122. Gatta V, Mengod G, Reale M, Tata AM. Possible Correlation between Cholinergic System Alterations and Neuro/Inflammation in Multiple Sclerosis. *Biomedicines*. 2020;8(6).
123. Keller MD, Jyonouchi S. Chipping away at a mountain: genomic studies in common variable immunodeficiency. *Autoimmun Rev*. 2013;12(6):687-9.
124. Di Bari M, Reale M, Di Nicola M, Orlando V, Galizia S, Porfilio I, et al. Dysregulated Homeostasis of Acetylcholine Levels in Immune Cells of RR-Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
125. Rao AA, Sridhar GR, Das UN. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*. 2007;69(6):1272-6.
126. Di Pinto G, Di Bari M, Martin-Alvarez R, Sperduti S, Serrano-Acedo S, Gatta V, et al. Comparative study of the expression of cholinergic system components in the CNS of experimental autoimmune encephalomyelitis mice: Acute vs remitting phase. *Eur J Neurosci*. 2018;48(5):2165-81.



127. Vijayaraghavan S, Karami A, Aeinehband S, Behbahani H, Grandien A, Nilsson B, et al. Regulated Extracellular Choline Acetyltransferase Activity- The Plausible Missing Link of the Distant Action of Acetylcholine in the Cholinergic AntiInflammatory Pathway. *PLoS One*. 2013;8(6):e65936.
128. Kutty KM, Payne RH. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. *J Clin Lab Anal*. 1994;8(4):247-50.
129. Rustemeijer C, Schouten JA, Voerman HJ, Beynen AC, Donker AJ, Heine RJ. Is pseudocholinesterase activity related to markers of triacylglycerol synthesis in Type II diabetes mellitus? *Clin Sci (Lond)*. 2001;101(1):29-35.
130. Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin Biochem*. 2005;38(9):799-805.
131. LeVine SM. Albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2016;16:47.
132. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008;582(13):1783-7.
133. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med*. 2012;33(3):209-90.
134. Rosenling T, Stoop MP, Attali A, van Aken H, Suidgeest E, Christin C, et al. Profiling and identification of cerebrospinal fluid proteins in a rat EAE model of multiple sclerosis. *J Proteome Res*. 2012;11(4):2048-60.
135. Monzani E, Bonafe B, Fallarini A, Redaelli C, Casella L, Minchiotti L, et al. Enzymatic properties of human hemalbumin. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1547(2):302-12.
136. Adams CW. Perivascular iron deposition and other vascular damage in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988;51(2):260-5.
137. Sands SA, Williams R, Marshall S, 3rd, LeVine SM. Perivascular iron deposits are associated with protein nitration in cerebral experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett*. 2014;582:133-8.
138. Visser M, Kritchevsky SB, Newman AB, Goodpaster BH, Tylavsky FA, Nevitt MC, et al. Lower serum albumin concentration and change in muscle mass: the Health, Aging and Body Composition Study. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(3):531-7.



139. Huang Y, Shinzawa H, Togashi H, Takahashi T, Kuzumaki T, Otsu K, et al. Interleukin-6 down-regulates expressions of the aldolase B and albumin genes through a pathway involving the activation of tyrosine kinase. *Arch Biochem Biophys*. 1995;320(2):203-9.
140. Huang CY, Liou SY, Kuo WW, Wu HC, Chang YL, Chen TS. Chemiluminescence analysis of antioxidant capacity for serum albumin isolated from healthy or uremic volunteers. *Luminescence*. 2016;31(8):1474-8.
141. Arques S. Human serum albumin in cardiovascular diseases. *Eur J Intern Med*. 2018;52:8-12.
142. Pop RM, Popolo A, Trifa AP, Stanciu LA. Phytochemicals in Cardiovascular and Respiratory Diseases: Evidence in Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1603872.
143. Arques S. [Serum albumin and cardiovascular diseases: A comprehensive review of the literature]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2018;67(2):82-90.
144. Kim JH, Kim YJ, Lee SM, Lee J. Comparison of salivary and serum cortisol levels in mechanically ventilated patients and non-critically ill patients. *Acute Crit Care*. 2020;35(3):149-55.
145. Marcello E, Gardoni F, Di Luca M. Alzheimer's disease and modern lifestyle: what is the role of stress? *J Neurochem*. 2015;134(5):795-8.
146. Butts CD, Bloom MS, Frye CA, Walf AA, Parsons PJ, Steuerwald AJ, et al. Urine cortisol concentration as a biomarker of stress is unrelated to IVF outcomes in women and men. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(12):1647-53.
147. Chen X, Gelaye B, Velez JC, Barbosa C, Pepper M, Andrade A, et al. Caregivers' hair cortisol: a possible biomarker of chronic stress is associated with obesity measures among children with disabilities. *BMC Pediatr*. 2015;15:9.
148. Hek K, Direk N, Newson RS, Hofman A, Hoogendijk WJ, Mulder CL, et al. Anxiety disorders and salivary cortisol levels in older adults: a population-based study. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(2):300-5.



149. Slominski RM, Tuckey RC, Manna PR, Jetten AM, Postlethwaite A, Raman C, et al. Extra-adrenal glucocorticoid biosynthesis: implications for autoimmune and inflammatory disorders. *Genes Immun*. 2020;21(3):150-68.
150. Pereira GM, Soares NM, Souza AR, Becker J, Finkelsztejn A, Almeida RMM. Basal cortisol levels and the relationship with clinical symptoms in multiple sclerosis: a systematic review. *Arq Neuropsiquiatr*. 2018;76(9):622-34.
151. Grasser A, Moller A, Backmund H, Yassouridis A, Holsboer F. Heterogeneity of hypothalamic-pituitary-adrenal system response to a combined dexamethasone-CRH test in multiple sclerosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1996;104(1):31-7.
152. Then Bergh F, Kumpfel T, Trenkwalder C, Rupprecht R, Holsboer F. Dysregulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis is related to the clinical course of MS. *Neurology*. 1999;53(4):772-7.
153. Pandya R, Metz L, Patten SB. Predictive value of the CES-D in detecting depression among candidates for disease-modifying multiple sclerosis treatment. *Psychosomatics*. 2005;46(2):131-4.
154. Feinstein A, Magalhaes S, Richard JF, Audet B, Moore C. The link between multiple sclerosis and depression. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(9):507-17.
155. Melief J, de Wit SJ, van Eden CG, Teunissen C, Hamann J, Uitdehaag BM, et al. HPA axis activity in multiple sclerosis correlates with disease severity, lesion type and gene expression in normal-appearing white matter. *Acta Neuropathol*. 2013;126(2):237-
- 49.
156. Lisieski MJ, Eagle AL, Conti AC, Liberzon I, Perrine SA. Single-Prolonged Stress: A Review of Two Decades of Progress in a Rodent Model of Post-traumatic Stress Disorder. *Front Psychiatry*. 2018;9:196.
157. Zhang L, Zhou R, Li X, Ursano RJ, Li H. Stress-induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non-genomic GR signaling: a possible mechanism for hippocampus atrophy in PTSD. *Med Hypotheses*. 2006;66(6):1205-8.



158. Vogelzangs N, Kritchevsky SB, Beekman AT, Newman AB, Satterfield S, Simonsick EM, et al. Depressive symptoms and change in abdominal obesity in older persons. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65(12):1386-93.
159. Incollingo Rodriguez AC, Epel ES, White ML, Standen EC, Seckl JR, Tomiyama AJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;62:301-18.
160. Tettey P, Simpson S, Taylor B, Ponsonby AL, Lucas RM, Dwyer T, et al. An adverse lipid profile and increased levels of adiposity significantly predict clinical course after a first demyelinating event. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(5):395-401.
161. Khan QU, Zaffar S, Rehan AM, Rashid RR, Ashraf H, Hafeez F. Relationship of Major Depression with Body Mass Index and Salivary Cortisol. *Cureus*. 2020;12(1):e6577.
162. Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Heintze U, Janke J, et al. Regulation of 11beta-HSD genes in human adipose tissue: influence of central obesity and weight loss. *Obes Res*. 2004;12(1):9-17.
163. Keenan DM, Roelfsema F, Veldhuis JD. Endogenous ACTH concentration-dependent drive of pulsatile cortisol secretion in the human. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(4):E652-61.
164. Lin HY, Muller YA, Hammond GL. Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;316(1):3-12.
165. Harper ME, Dugaiczky A. Linkage of the evolutionarily-related serum albumin and alpha-fetoprotein genes within q11-22 of human chromosome 4. *Am J Hum Genet*. 1983;35(4):565-72.
166. Doshi A, Chataway J. Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clin Med (Lond)*. 2016;16(Suppl 6):s53-s9.
167. Hart FM, Bainbridge J. Current and emerging treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care*. 2016;22(6 Suppl):s159-70.



168. Laurson-Doube J, Rijke N, Helme A, Baneke P, Banwell B, Viswanathan S, et al. Ethical use of off-label disease-modifying therapies for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2021;27(9):1403-10.
169. Gajofatto A, Benedetti MD. Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? *World J Clin Cases.* 2015;3(7):545-55.
170. Abenavoli L, Milic N, Luzza F, Boccuto L, De Lorenzo A. Polyphenols Treatment in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Transl Int Med.* 2017;5(3):144-7.
171. Bertelli A, Biagi M, Corsini M, Bainsi G, Cappellucci G, Miraldi E. Polyphenols: From Theory to Practice. *Foods.* 2021;10(11).
172. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.* 2012 ;27(1): 76-89.
173. Hu B, Liu X, Zhang C, Zeng X. Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *J Food Drug Anal.* 2017;25(1):3-15.
174. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010;2(12):1231-46.
175. Kakutani S, Watanabe H, Murayama N. Green Tea Intake and Risks for Dementia, Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, and Cognitive Impairment: A Systematic Review. *Nutrients.* 2019;11(5).
176. Pervin M, Unno K, Ohishi T, Tanabe H, Miyoshi N, Nakamura Y. Beneficial Effects of Green Tea Catechins on Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2018;23(6).
177. Ivashynka A, Leone MA, Barizzone N, Cucovici A, Cantello R, Vecchio D, et al. The impact of lifetime coffee and tea loads on Multiple Sclerosis severity. *Clin Nutr ESPEN.* 2022;47:199-205.
178. Farzaei MH, Bahramsoltani R, Abbasabadi Z, Braidy N, Nabavi SM. Role of green tea catechins in prevention of age-related cognitive decline: Pharmacological targets and clinical perspective. *J Cell Physiol.* 2019;234(3):2447-59.
179. Subash S, Essa MM, Al-Adawi S, Memon MA, Manivasagam T, Akbar M.



- Neuroprotective effects of berry fruits on neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2014;9(16):1557-66.
180. Wang J, Ren Z, Xu Y, Xiao S, Meydani SN, Wu D. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering balance among CD4+ T-cell subsets. *Am J Pathol.* 2012;180(1):221-34.
 181. Wu D, Wang J, Pae M, Meydani SN. Green tea EGCG, T cells, and T cell-mediated autoimmune diseases. *Mol Aspects Med.* 2012;33(1):107-18.
 182. Platero JL, Cuerda-Ballester M, Ibanez V, Sancho D, Lopez-Rodriguez MM, Drehmer E, et al. The Impact of Coconut Oil and Epigallocatechin Gallate on the Levels of IL-6, Anxiety and Disability in Multiple Sclerosis Patients. *Nutrients.* 2020;12(2).
 183. Ganesan P, Ko HM, Kim IS, Choi DK. Recent trends in the development of nanophytobioactive compounds and delivery systems for their possible role in reducing oxidative stress in Parkinson's disease models. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:6757-72.
 184. Shirakami Y, Sakai H, Kochi T, Seishima M, Shimizu M. Catechins and Its Role in Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2016;929:67-90.
 185. Suliburska J, Bogdanski P, Szulinska M, Stepień M, Pupek-Musialik D, Jablecka A. Effects of green tea supplementation on elements, total antioxidants, lipids, and glucose values in the serum of obese patients. *Biol Trace Elem Res.* 2012;149(3):315-22.
 186. Stelzer I, Zelzer S, Raggam RB, Pruller F, Truschnig-Wilders M, Meinitzer A, et al. Link between leptin and interleukin-6 levels in the initial phase of obesity related inflammation. *Transl Res.* 2012;159(2):118-24.
 187. Gupta D, Krueger CB, Lastra G. Over-nutrition, obesity and insulin resistance in the development of beta-cell dysfunction. *Curr Diabetes Rev.* 2012;8(2):76-83.
 188. Thavanesan N. The putative effects of green tea on body fat: an evaluation of the evidence and a review of the potential mechanisms. *Br J Nutr.* 2011;106(9):1297-309.



189. Rains TM, Agarwal S, Maki KC. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. *J Nutr Biochem*. 2011;22(1):1-7.
190. Wang H, Wen Y, Du Y, Yan X, Guo H, Rycroft JA, et al. Effects of catechin enriched green tea on body composition. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(4):773-9.
191. Yanoff LB, Menzie CM, Denkinger B, Sebring NG, McHugh T, Remaley AT, et al. Inflammation and iron deficiency in the hypoferremia of obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31(9):1412-9.
192. Soltani N, Keshavarz M, Minaii B, Mirershadi F, Zahedi Asl S, Dehpour AR. Effects of administration of oral magnesium on plasma glucose and pathological changes in the aorta and pancreas of diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(8):604-10.
193. Basu A, Sanchez K, Leyva MJ, Wu M, Betts NM, Aston CE, et al. Green tea supplementation affects body weight, lipids, and lipid peroxidation in obese subjects with metabolic syndrome. *J Am Coll Nutr*. 2010;29(1):31-40.
194. Cao SY, Zhao CN, Gan RY, Xu XY, Wei XL, Corke H, et al. Effects and Mechanisms of Tea and Its Bioactive Compounds for the Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases: An Updated Review. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(6).
195. Brown AL, Lane J, Coverly J, Stocks J, Jackson S, Stephen A, et al. Effects of dietary supplementation with the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on insulin resistance and associated metabolic risk factors: randomized controlled trial. *Br J Nutr*. 2009;101(6):886-94.
196. Wu AH, Spicer D, Stanczyk FZ, Tseng CC, Yang CS, Pike MC. Effect of 2-month controlled green tea intervention on lipoprotein cholesterol, glucose, and hormone levels in healthy postmenopausal women. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(3):393-402.
197. Bach AC, Frey A, Lutz O. Clinical and experimental effects of medium-chain triglyceride-based fat emulsions--a review. *Clin Nutr*. 1989;8(5):223-35.



198. McCarty MF, DiNicolantonio JJ. Lauric acid-rich medium-chain triglycerides can substitute for other oils in cooking applications and may have limited pathogenicity. *Open Heart*. 2016 Jul 27;3(2):e000467.
199. Sayago-Ayerdi SG, Vaquero MP, Schultz-Moreira A, Bastida S, Sanchez-Muniz FJ. Usefulness and controversial issues of middle-chain fatty acids consumption on lipidprotein metabolism and obesity. *Nutr Hosp*. 2008;23(3):191-202.
200. McCarty MF. Promotion of hepatic lipid oxidation and gluconeogenesis as a strategy for appetite control. *Med Hypotheses*. 1994;42(4):215-25.
201. Krotkiewski M. Value of VLCD supplementation with medium chain triglycerides. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25(9):1393-400.
202. Aas M. Organ and subcellular distribution of fatty acid activating enzymes in the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1971;231(1):32-47
203. Metges CC, Wolfram G. Medium- and long-chain triglycerides labeled with ¹³C: a comparison of oxidation after oral or parenteral administration in humans. *J Nutr*. 1991;121(1):31-6.
204. Odle J, Benevenga NJ, Crenshaw TD. Utilization of medium-chain triglycerides by neonatal piglets: chain length of even- and odd-carbon fatty acids and apparent digestion/absorption and hepatic metabolism. *J Nutr*. 1991;121(5):605-14.
205. El aceite de coco. Composición y propiedades del Aceite de Coco [Internet]. [Consultado 2 Dic 2022]. Disponible en: <https://www.aceitedecoco.org/composicion-ypropiedades-del-aceite-de-coco/>.
206. Henderson ST, Vogel JL, Barr LJ, Garvin F, Jones JJ, Costantini LC. Study of the ketogenic agent AC-1202 in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Nutr Metab (Lond)*. 2009;6:31.
207. Platero JL, López-Rodríguez MM, García-Pardo P, de la Rubia Ortí JE. Possible Benefits of Coconut Oil in Multiple Sclerosis. *Ann Food Process Preserv*. 2018; 3(1): 1024.
208. Dupuis L, Pradat PF, Ludolph AC, Loeffler JP. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2011;10(1):75-82.



209. Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J.* 2012;31(14):3038-62.
210. Stafstrom CE, Rho JM. The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. *Front Pharmacol.* 2012;3:59.
211. Deng-Bryant Y, Prins ML, Hovda DA, Harris NG. Ketogenic diet prevents alterations in brain metabolism in young but not adult rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2011;28(9):1813-25.
212. Cheng B, Yang X, An L, Gao B, Liu X, Liu S. Ketogenic diet protects dopaminergic neurons against 6-OHDA neurotoxicity via up-regulating glutathione in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2009;1286:25-31.
213. de la Rubia Orti JE, Garcia-Pardo MP, Drehmer E, Sancho Cantus D, Julian Rochina M, Aguilar MA, et al. Improvement of Main Cognitive Functions in Patients with Alzheimer's Disease after Treatment with Coconut Oil Enriched Mediterranean Diet: A Pilot Study. *J Alzheimers Dis.* 2018;65(2):577-87.
214. Offermanns S. Hydroxy-Carboxylic Acid Receptor Actions in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(3):227-36.
215. Hernandez AR, Hernandez CM, Campos K, Truckenbrod L, Federico Q, Moon B, et al. A Ketogenic Diet Improves Cognition and Has Biochemical Effects in Prefrontal Cortex That Are Dissociable From Hippocampus. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:391.
216. Rocca MA, Barkhof F, De Luca J, Frisen J, Geurts JJG, Hulst HE, et al. The hippocampus in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2018;17(10):918-26.
217. Jaeger S, Paul F, Scheel M, Brandt A, Heine J, Pach D, et al. Multiple sclerosis-related fatigue: Altered resting-state functional connectivity of the ventral striatum and dorsolateral prefrontal cortex. *Mult Scler.* 2019;25(4):554-64.
218. McKee J, McKee T. *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida* [Internet] 5th ed. Madrid: Interamericana; Disponible en:
<https://co.pinterest.com/pin/411938697140578013/>



219. Nair KS, Welle SL, Halliday D, Campbell RG. Effect of beta-hydroxybutyrate on whole-body leucine kinetics and fractional mixed skeletal muscle protein synthesis in humans. *J Clin Invest.* 1988;82(1):198-205.
220. Dabos KJ, Parkinson JA, Sadler IH, Plevris JN, Hayes PC. (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabonomic study in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *World J Hepatol.* 2015;7(12):1701-7.
221. Nair KS, Welle SL, Halliday D, Campbell RG. Effect of beta-hydroxybutyrate on whole-body leucine kinetics and fractional mixed skeletal muscle protein synthesis in humans. *J Clin Invest.* 1988;82(1):198-205.
222. Evans M, Cogan KE, Egan B. Metabolism of ketone bodies during exercise and training: physiological basis for exogenous supplementation. *J Physiol.* 2017;595(9):2857-71.
223. Thompson JR, Wu G. The effect of ketone bodies on nitrogen metabolism in skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol B.* 1991;100(2):209-16.
224. Thomsen HH, Rittig N, Johannsen M, Moller AB, Jorgensen JO, Jessen N, et al. Effects of 3-hydroxybutyrate and free fatty acids on muscle protein kinetics and signaling during LPS-induced inflammation in humans: anticatabolic impact of ketone bodies. *Am J Clin Nutr.* 2018;108(4):857-67.
225. Zhao Z, Lange DJ, Voustantiouk A, MacGrogan D, Ho L, Suh J, et al. A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurosci.* 2006;7:29.
226. Vogel CE, Crovesy L, Rosado EL, Soares-Mota M. Effect of coconut oil on weight loss and metabolic parameters in men with obesity: a randomized controlled clinical trial. *Food Funct.* 2020;11(7):6588-94.
227. Eyres L, Eyres MF, Chisholm A, Brown RC. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutr Rev.* 2016;74(4):267-80.
228. Khaw KT, Sharp SJ, Finikarides L, Afzal I, Lentjes M, Luben R, et al. Randomised trial of coconut oil, olive oil or butter on blood lipids and other cardiovascular risk factors in healthy men and women. *BMJ Open.* 2018;8(3):e020167.



229. Sacks FM, Lichtenstein AH, Wu JHY, Appel LJ, Creager MA, Kris-Etherton PM, et al. Dietary Fats and Cardiovascular Disease: A Presidential Advisory From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;136(3):e1-e23.
230. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):121-
- 7.
231. Gibson AA, Seimon RV, Lee CM, Ayre J, Franklin J, Markovic TP, et al. Do ketogenic diets really suppress appetite? A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2015;16(1):64-76.
232. Volek JS, Phinney SD, Forsythe CE, Quann EE, Wood RJ, Puglisi MJ, et al. Carbohydrate restriction has a more favorable impact on the metabolic syndrome than a low fat diet. *Lipids*. 2009;44(4):297-309.
233. Karupaiah T. Limited (ISAK) profiling The International Society for the Advancement of Kinanthropometry (ISAK). *Journal of Renal Nutrition and Metabolism*. 2018;3(1):11.
234. Huxley R, Mendis S, Zheleznyakov E, Reddy S, Chan J. Body mass index, waist circumference and waist:hip ratio as predictors of cardiovascular risk--a review of the literature. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64(1):16-22.
235. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*. 2005;366(9497):1640-9.
236. Browning LM, Hsieh SD, Ashwell M. A systematic review of waist-to-height ratio as a screening tool for the prediction of cardiovascular disease and diabetes: 0.5 could be a suitable global boundary value. *Nutr Res Rev*. 2010;23(2):247-69.
237. Faulkner J.A. *Fisiología de la Natación y el Buceo. Fisiología del ejercicio*. Prensa Académica; Baltimore, MD, Estados Unidos: 1968
238. Rocha M.S.L. Peso óseo do brasileiro de ambos os sexos de 17 a 25 años. *Arq. Anatomía Antropol*. 1975; 1:445-451.
239. Matiegka J. La prueba de la eficiencia física. *Am. J. Phys*. 1921; 4:223-230. doi: 10.1002/ajpa.1330040302.



240. Alvero J., Cabañas M., Herrero de Lucas A., Martínez L., Moreno C., Porta J., Sillero M., Sirvent J., Belando M. Protocolo de valoración de la composición corporal para el reconocimiento médico-deportivo. *Doc. Consenso Grupo Esp. Cineantropometría Fed. Esp. Med. Deporte*. 2009; 16:166–179.
241. Tecles F, Martínez Subiela S, Bernal LJ, Ceron JJ. Use of whole blood for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs. *Vet J*. 2000;160(3):242-9.
242. Ceron JJ, Tecles F, Tvarijonavičiute A. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Vet Res*. 2014;10:74.
243. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52.
244. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-
- 4.
245. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86.
246. Westerlind H, Bostrom I, Stawiarz L, Landtblom AM, Almqvist C, Hillert J. New data identify an increasing sex ratio of multiple sclerosis in Sweden. *Mult Scler*. 2014;20(12):1578-83.
247. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, et al. 2018
AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCN
A
Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(24):e285-e350.
248. American Diabetes A. 10. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S125S50.



249. Perrin Ross A, Williamson A, Smrtka J, Flemming Tracy T, Saunders C, Easterling C, et al. Assessing relapse in multiple sclerosis questionnaire: results of a pilot study. *Mult Scler Int.* 2013;2013:470476.
250. de Oliveira C, de Mattos AB, Biz C, Oyama LM, Ribeiro EB, do Nascimento CM. High-fat diet and glucocorticoid treatment cause hyperglycemia associated with adiponectin receptor alterations. *Lipids Health Dis.* 2011;10:11.
251. Raatz SK, Conrad Z, Johnson LK, Picklo MJ, Jahns L. Relationship of the Reported Intakes of Fat and Fatty Acids to Body Weight in US Adults. *Nutrients.* 2017;9(5).
252. Moore JB, Fielding BA. Sugar and metabolic health: is there still a debate? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2016;19(4):303-9.
253. Ma J, McKeown NM, Hwang SJ, Hoffmann U, Jacques PF, Fox CS. Sugar-Sweetened Beverage Consumption Is Associated With Change of Visceral Adipose Tissue Over 6 Years of Follow-Up. *Circulation.* 2016;133(4):370-7.
254. Drehmer E, Navarro-Moreno MA, Carrera S, Villar VM, Moreno ML. Oxygenic metabolism in nutritional obesity induced by olive oil. The influence of vitamin C. *Food Funct.* 2019;10(6):3567-80.
255. Fritsche KL. The science of fatty acids and inflammation. *Adv Nutr.* 2015;6(3):293S-301S.
256. Matusik E, Augustak A, Durmala J. Functional Mobility and Basic Motor Skills in Patients with Multiple Sclerosis and Its Relation to the Anthropometrical Status and Body Composition Parameters. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(12).
257. Fellows Maxwell K, Wahls T, Browne RW, Rubenstein L, Bisht B, Chenard CA, et al. Lipid profile is associated with decreased fatigue in individuals with progressive multiple sclerosis following a diet-based intervention: Results from a pilot study. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218075.
258. Della Corte KW, Perrar I, Penczynski KJ, Schwingshackl L, Herder C, Buyken AE. Effect of Dietary Sugar Intake on Biomarkers of Subclinical Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Intervention Studies. *Nutrients.* 2018;10(5).



259. Stelmasiak Z, Koziol-Montewka M, Dobosz B, Rejdak K. IL-6 and sIL-6R concentration in the cerebrospinal fluid and serum of MS patients. *Med Sci Monit.* 2001;7(5):914-8.
260. Bongioanni P, Mosti S, Romano MR, Lombardo F, Moscato G, Meucci G. Increased T-lymphocyte interleukin-6 binding in patients with multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2000;7(3):291-7.
261. Benlloch M, Lopez-Rodriguez MM, Cuerda-Ballester M, Drehmer E, Carrera S, Ceron JJ, et al. Satiating Effect of a Ketogenic Diet and Its Impact on Muscle Improvement and Oxidation State in Multiple Sclerosis Patients. *Nutrients.* 2019;11(5).
262. Liang B, Li YH, Kong H. Serum paraoxonase, arylesterase activities and oxidative status in patients with insomnia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(18):2517-22.
263. Vazquez Cisneros LC, Lopez-Uriarte P, Lopez-Espinoza A, Navarro Meza M, Espinoza-Gallardo AC, Guzman Aburto MB. Effects of green tea and its epigallocatechin (EGCG) content on body weight and fat mass in humans: a systematic review. *Nutr Hosp.* 2017;34(3):731-7.
264. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(4):225-38.
265. Santos FL, Esteves SS, da Costa Pereira A, Yancy WS, Jr., Nunes JP. Systematic review and meta-analysis of clinical trials of the effects of low carbohydrate diets on cardiovascular risk factors. *Obes Rev.* 2012;13(11):1048-66.
266. Volek JS, Phinney SD, Forsythe CE, Quann EE, Wood RJ, Puglisi MJ, et al. Carbohydrate restriction has a more favorable impact on the metabolic syndrome than a low fat diet. *Lipids.* 2009;44(4):297-309.
267. Gan L, Meng ZJ, Xiong RB, Guo JQ, Lu XC, Zheng ZW, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate ameliorates insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(5):597-605.



268. Scheld M, Fragoulis A, Nyamoya S, Zendedel A, Denecke B, Krauspe B, et al. Mitochondrial Impairment in Oligodendroglial Cells Induces Cytokine Expression and Signaling. *J Mol Neurosci*. 2019;67(2):265-75.
269. de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R. Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011;61(2):255-9, 60-5, 137-42.
270. Johnson SL, Kirk RD, DaSilva NA, Ma H, Seeram NP, Bertin MJ. Polyphenol Microbial Metabolites Exhibit Gut and Blood(-)Brain Barrier Permeability and Protect Murine Microglia against LPS-Induced Inflammation. *Metabolites*. 2019;9(4).
271. Mena MP, Sacanella E, Vazquez-Agell M, Morales M, Fito M, Escoda R, et al. Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(1):248-56.
272. Don BR, Kaysen G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. *Semin Dial*. 2004;17(6):432-7.
273. Quispe EA, Li XM, Yi H. Comparison and relationship of thyroid hormones, IL6, IL-10 and albumin as mortality predictors in case-mix critically ill patients. *Cytokine*. 2016;81:94-100.
274. Polachini CR, Spanevello RM, Casali EA, Zanini D, Pereira LB, Martins CC, et al. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience*. 2014;266:266-74.
275. Di Pinto G, Di Bari M, Martin-Alvarez R, Sperduti S, Serrano-Acedo S, Gatta V, et al. Comparative study of the expression of cholinergic system components in the CNS of experimental autoimmune encephalomyelitis mice: Acute vs remitting phase. *Eur J Neurosci*. 2018;48(5):2165-81.
276. Kutty KM, Jain R, Huang S, Kean K. Serum pseudocholinesterase: high density lipoprotein cholesterol ratio as an index of risk for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 1981;115(1):55-61.
277. Shokri Y, Variji A, Nosrati M, Khonakdar-Tarsi A, Kianmehr A, Kashi Z, et al. Importance of paraoxonase 1 (PON1) as an antioxidant and antiatherogenic enzyme in the cardiovascular complications of type 2 diabetes: Genotypic and phenotypic evaluation. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;161:108067.



278. Duysen EG, Li B, Lockridge O. The butyrylcholinesterase knockout mouse a research tool in the study of drug sensitivity, bio-distribution, obesity and Alzheimer's disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009;5(5):523-8.
279. Pfohl M, Koch M, Enderle MD, Kuhn R, Fullhase J, Karsch KR, et al. Paraoxonase 192 Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999;48(3):623-7.
280. Valle A, O'Connor DT, Taylor P, Zhu G, Montgomery GW, Slagboom PE, et al. Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. *Clin Chem.* 2006;52(6):1014-20.
281. Welty FK. How do elevated triglycerides and low HDL-cholesterol affect inflammation and atherothrombosis? *Curr Cardiol Rep.* 2013;15(9):400.
282. Aeinehband S, Lindblom RP, Al Nimer F, Vijayaraghavan S, Sandholm K, Khademi M, et al. Complement component C3 and butyrylcholinesterase activity are associated with neurodegeneration and clinical disability in multiple sclerosis. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122048.
283. De la Rubia Orti JE, Platero JL, Yang IH, Ceron JJ, Tvarijonaviciute A, Sabater PS, et al. Possible Role of Butyrylcholinesterase in Fat Loss and Decreases in Inflammatory Levels in Patients with Multiple Sclerosis after Treatment with Epigallocatechin Gallate and Coconut Oil: A Pilot Study. *Nutrients.* 2021;13(9).
284. Patten SB, Marrie RA, Carta MG. Depression in multiple sclerosis. *Int Rev Psychiatry.* 2017;29(5):463-72.
285. Lee B, Shim I, Lee H, Hahm DH. Effects of Epigallocatechin Gallate on Behavioral and Cognitive Impairments, Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Dysfunction, and Alternations in Hippocampal BDNF Expression Under Single Prolonged Stress. *J Med Food.* 2018;21(10):979-89.
286. Loftis JM, Wilhelm CJ, Huckans M. Effect of epigallocatechin gallate supplementation in schizophrenia and bipolar disorder: an 8-week, randomized, doubleblind, placebo-controlled study. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2013;3(1):21-7.
287. Rai A, Gill M, Kinra M, Shetty R, Krishnadas N, Rao CM, et al. Catechin ameliorates depressive symptoms in Sprague Dawley rats subjected to chronic



- unpredictable mild stress by decreasing oxidative stress. *Biomed Rep.* 2019;11(2):79-
- 84.
288. Platero JL, Cuerda-Ballester M, Sancho-Cantus D, Benlloch M, Ceron JJ, Peres Rubio C, et al. The Impact of Epigallocatechin Gallate and Coconut Oil Treatment on Cortisol Activity and Depression in Multiple Sclerosis Patients. *Life (Basel)*. 2021;11(4).
289. Chen WQ, Zhao XL, Wang DL, Li ST, Hou Y, Hong Y, et al. Effects of epigallocatechin-3-gallate on behavioral impairments induced by psychological stress in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010;235(5):577-83.
290. Hintzpeter J, Stapelfeld C, Loerz C, Martin HJ, Maser E. Green tea and one of its constituents, Epigallocatechine-3-gallate, are potent inhibitors of human 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 1. *PLoS One*. 2014;9(1):e84468.
291. Hamrahian AH, Oseni TS, Arafah BM. Measurements of serum free cortisol in critically ill patients. *N Engl J Med*. 2004;350(16):1629-38.
292. Huang Y, Shinzawa H, Togashi H, Takahashi T, Kuzumaki T, Otsu K, et al. Interleukin-6 down-regulates expressions of the aldolase B and albumin genes through a pathway involving the activation of tyrosine kinase. *Arch Biochem Biophys*. 1995;320(2):203-9.
293. Hryhorczuk C, Sharma S, Fulton SE. Metabolic disturbances connecting obesity and depression. *Front Neurosci*. 2013;7:177.
294. Wiltink J, Michal M, Wild PS, Zwiener I, Blettner M, Munzel T, et al. Associations between depression and different measures of obesity (BMI, WC, WHtR, WHR). *BMC Psychiatry*. 2013;13:223.
295. Carrasco-Pozo C, Cires MJ, Gotteland M. Quercetin and Epigallocatechin Gallate in the Prevention and Treatment of Obesity: From Molecular to Clinical Studies. *J Med Food*. 2019;22(8):753-70.
296. Li F, Gao C, Yan P, Zhang M, Wang Y, Hu Y, et al. EGCG Reduces Obesity and White Adipose Tissue Gain Partly Through AMPK Activation in Mice. *Front Pharmacol*. 2018;9:1366.



297. DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH. Good Fats versus Bad Fats: A Comparison of Fatty Acids in the Promotion of Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity. *Mo Med*. 2017;114(4):303-7.
298. Gibson AA, Seimon RV, Lee CM, Ayre J, Franklin J, Markovic TP, et al. Do ketogenic diets really suppress appetite? A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2015;16(1):64-76.
299. Sussman D, Germann J, Henkelman M. Gestational ketogenic diet programs brain structure and susceptibility to depression & anxiety in the adult mouse offspring. *Brain Behav*. 2015;5(2):e00300.
300. Murphy P, Likhodii S, Nylen K, Burnham WM. The antidepressant properties of the ketogenic diet. *Biol Psychiatry*. 2004;56(12):981-3.
301. Alcocer-Gomez E, de Miguel M, Casas-Barquero N, Nunez-Vasco J, SanchezAlcazar JA, Fernandez-Rodriguez A, et al. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun*. 2014;36:111-7.
302. Kaufmann FN, Costa AP, Ghisleni G, Diaz AP, Rodrigues ALS, Peluffo H, et al. NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: Clinical and preclinical findings. *Brain Behav Immun*. 2017;64:367-83.
303. Wallis O, Bol Y, Kohler S, van Heugten C. Anxiety in multiple sclerosis is related to depressive symptoms and cognitive complaints. *Acta Neurol Scand*. 2020;141(3):212-
- 8.
304. Benlloch M, Cuerda Ballester M, Drehmer E, Platero JL, Carrera-Julia S, LopezRodriguez MM, et al. Possible Reduction of Cardiac Risk after Supplementation with Epigallocatechin Gallate and Increase of Ketone Bodies in the Blood in Patients with Multiple Sclerosis. A Pilot Study. *Nutrients*. 2020;12(12).
305. Wens I, Dalgas U, Vandenabeele F, Grevendonk L, Verboven K, Hansen D, et al. High Intensity Exercise in Multiple Sclerosis: Effects on Muscle Contractile



- Characteristics and Exercise Capacity, a Randomised Controlled Trial. *PLoS One*. 2015;10(9):e0133697.
306. Li RJ, Liu Y, Liu HQ, Li J. Ketogenic diets and protective mechanisms in epilepsy, metabolic disorders, cancer, neuronal loss, and muscle and nerve degeneration. *J Food Biochem*. 2020;44(3):e13140.
307. Kim AR, Kim KM, Byun MR, Hwang JH, Park JI, Oh HT, et al. Catechins activate muscle stem cells by Myf5 induction and stimulate muscle regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;489(2):142-8.
308. Huang HY, Wang MC, Chen ZY, Chiu WY, Chen KH, Lin IC, et al. Gelatin-epigallocatechin gallate nanoparticles with hyaluronic acid decoration as eye drops can treat rabbit dry-eye syndrome effectively via inflammatory relief. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:7251-73.
309. Amani M, Zolghadrnasab M, Salari AA. NMDA receptor in the hippocampus alters neurobehavioral phenotypes through inflammatory cytokines in rats with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiol Behav*. 2019;202:52-61.
310. Butt OI, Buehler PW, D'Agnillo F. Blood-brain barrier disruption and oxidative stress in guinea pig after systemic exposure to modified cell-free hemoglobin. *Am J Pathol*. 2011;178(3):1316-28.
311. Casanova E, Salvado J, Crescenti A, Gibert-Ramos A. Epigallocatechin Gallate Modulates Muscle Homeostasis in Type 2 Diabetes and Obesity by Targeting Energetic and Redox Pathways: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
312. Fukazawa A, Koike A, Karasawa T, Tsutsui M, Kondo S, Terada S. Effects of a Ketogenic Diet Containing Medium-Chain Triglycerides and Endurance Training on Metabolic Enzyme Adaptations in Rat Skeletal Muscle. *Nutrients*. 2020;12(5).
313. Schaer CA, Deuel JW, Bittermann AG, Rubio IG, Schoedon G, Spahn DR, et al. Mechanisms of haptoglobin protection against hemoglobin peroxidation triggered endothelial damage. *Cell Death Differ*. 2013;20(11):1569-79.
314. De la Rubia Orti JE, Platero JL, Benlloch M, Franco-Martinez L, Tvarijonaviciute A, Escriba-Alepuz J, et al. Role of Haptoglobin as a Marker of Muscular Improvement in Patients with Multiple Sclerosis after Administration of Epigallocatechin Gallate and Increase of Beta-Hydroxybutyrate in the Blood: A Pilot Study. *Biomolecules*. 2021;11(5).



315. Galicia G, Maes W, Verbinnen B, Kasran A, Bullens D, Arredouani M, et al. Haptoglobin deficiency facilitates the development of autoimmune inflammation. *Eur J Immunol.* 2009;39(12):3404-12.
316. Jelena A, Mirjana M, Desanka B, Svetlana IM, Aleksandra U, Goran P, et al. Haptoglobin and the inflammatory and oxidative status in experimental diabetic rats: antioxidant role of haptoglobin. *J Physiol Biochem.* 2013;69(1):45-58.
317. Li SC, Lee CC, Hsu CM, Huang HB, Su YC. IL-6 induces haptoglobin expression through activating STAT3 in human head and neck cancer. *J Oral Pathol Med.* 2020;49(1):49-54.
318. Murphy S, Dowling P, Zweyer M, Henry M, Meleady P, Mundegar RR, et al. Proteomic profiling of mdx-4cv serum reveals highly elevated levels of the inflammation-induced plasma marker haptoglobin in muscular dystrophy. *Int J Mol Med.* 2017;39(6):1357-70.
319. Bezard J, Bugaut M, Clement G. Composición de triglicéridos del aceite de coco. Mermelada. *Química del aceite. Soc.* 1971;48:134–139.
320. Ramya V, Shyam KP, Kowsalya E, Balavigneswaran CK, Kadalmani B. Dual Roles of Coconut Oil and Its Major Component Lauric Acid on Redox Nexus: Focus on Cytoprotection and Cancer Cell Death. *Front Neurosci.* 2022;16:833630.
321. De la Rubia Orti JE, Sanchez Alvarez C, Selvi Sabater P, Bueno Cayo AM, Sancho Castillo S, Rochina MJ, et al. How does coconut oil affect cognitive performance in alzheimer patients? *Nutr Hosp.* 2017;34(2):352-6.
322. Son HK, Kim BH, Lee J, Park S, Oh CB, Jung S, et al. Partial Replacement of Dietary Fat with Krill Oil or Coconut Oil Alleviates Dyslipidemia by Partly Modulating Lipid Metabolism in Lipopolysaccharide-Injected Rats on a High-Fat Diet. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(2).
323. Narayanankutty A, Palliyil DM, Kuruvilla K, Raghavamenon AC. Virgin coconut oil reverses hepatic steatosis by restoring redox homeostasis and lipid metabolism in male Wistar rats. *J Sci Food Agric.* 2018;98(5):1757-64.



324. Alatawi KA, Alshubaily FA. Coconut products alleviate hyperglycaemic, hyperlipidemic and nephropathy indices in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Saudi J Biol Sci.* 2021;28(8):4224-31.
325. Huang JB, Zhang Y, Zhou YB, Wan XC, Zhang JS. Effects of epigallocatechin gallate on lipid metabolism and its underlying molecular mechanism in broiler chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2015;99(4):719-27.
326. Mirzaei F, Khazaei M, Komaki A, Amiri I, Jalili C. Virgin coconut oil (VCO) by normalizing NLRP3 inflammasome showed potential neuroprotective effects in Amyloid-beta induced toxicity and high-fat diet fed rat. *Food Chem Toxicol.* 2018;118:68-83.
327. Famurewa AC, Ejezie FE. Polyphenols isolated from virgin coconut oil attenuate cadmium-induced dyslipidemia and oxidative stress due to their antioxidant properties and potential benefits on cardiovascular risk ratios in rats. *Avicenna J Phytomed.* 2018;8(1):73-84.
328. Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Nagasawa A, Tokimitsu I. Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(3):R708-15.
329. Quinones M, Miguel M, Aleixandre A. [The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease]. *Nutr Hosp.* 2012;27(1):76-89.
330. Huxley R, Mendis S, Zheleznyakov E, Reddy S, Chan J. Body mass index, waist circumference and waist:hip ratio as predictors of cardiovascular risk--a review of the literature. *Eur J Clin Nutr.* 2010;64(1):16-22.
331. Amirabdollahian F, Haghighatdoost F. Anthropometric Indicators of Adiposity Related to Body Weight and Body Shape as Cardiometabolic Risk Predictors in British Young Adults: Superiority of Waist-to-Height Ratio. *J Obes.* 2018;2018:8370304.
332. Park J, Kim NH, Kim SH, Kim JS, Kim YH, Lim HE, et al. Visceral adiposity and skeletal muscle mass are independently and synergistically associated with left ventricular structure and function: the Korean Genome and Epidemiology Study. *Int J Cardiol.* 2014;176(3):951-5.



333. Chaves GS, Ghisi GL, Grace SL, Oh P, Ribeiro AL, Britto RR. Effects of comprehensive cardiac rehabilitation on functional capacity and cardiovascular risk factors in Brazilians assisted by public health care: protocol for a randomized controlled trial. *Braz J Phys Ther.* 2016;20(6):592-600.
334. Dayrit FM. The Properties of Lauric Acid and Their Significance in Coconut Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2015; 92:1–15.
335. Sackner-Bernstein J, Kanter D, Kaul S. Dietary Intervention for Overweight and Obese Adults: Comparison of Low-Carbohydrate and Low-Fat Diets. A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139817.
336. Carrera-Julia S, Moreno ML, Barrios C, de la Rubia Orti JE, Drehmer E. Antioxidant Alternatives in the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Comprehensive Review. *Front Physiol.* 2020;11:63.
337. Eng QY, Thanikachalam PV, Ramamurthy S. Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. *J Ethnopharmacol.* 2018;210:296-310.
338. Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, Mo H, Shastri A, Su R, et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem.* 2014;25(1):1-18.
339. Lee MS, Kim CT, Kim Y. Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Ann Nutr Metab.* 2009;54(2):151-7.
340. Hill AM, Coates AM, Buckley JD, Ross R, Thielecke F, Howe PR. Can EGCG reduce abdominal fat in obese subjects? *J Am Coll Nutr.* 2007;26(4):396S-402S.
341. Ebbeling CB, Swain JF, Feldman HA, Wong WW, Hachey DL, Garcia-Lago E, et al. Effects of dietary composition on energy expenditure during weight-loss maintenance. *JAMA.* 2012;307(24):2627-34.
342. Westman EC, Feinman RD, Mavropoulos JC, Vernon MC, Volek JS, Wortman JA, et al. Low-carbohydrate nutrition and metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(2):276-



343. Cao Q, Yu S, Xiong W, Li Y, Li H, Li J, et al. Waist-hip ratio as a predictor of myocardial infarction risk: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(30):e11639.
344. Alshamiri MQ, Mohd AHF, Al-Qahtani SS, Alghalayini KA, Al-Qattan OM, ElShaer F. Waist-to-Height Ratio (WHtR) in Predicting Coronary Artery Disease Compared to Body Mass Index and Waist Circumference in a Single Center from Saudi Arabia. *Cardiol Res Pract*. 2020;2020:4250793.
345. Li P, Liu A, Liu C, Qu Z, Xiao W, Huang J, et al. Role and mechanism of catechin in skeletal muscle cell differentiation. *J Nutr Biochem*. 2019;74:108225.
346. Veldhorst M, Smeets A, Soenen S, Hochstenbach-Waelen A, Hursel R, Diepvens K, et al. Protein-induced satiety: effects and mechanisms of different proteins. *Physiol Behav*. 2008;94(2):300-7.
347. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci*. 2017;13(4):851-63.
348. Ronit A, Kirkegaard-Klitbo DM, Dohlmann TL, Lundgren J, Sabin CA, Phillips AN, et al. Plasma Albumin and Incident Cardiovascular Disease: Results From the CGPS and an Updated Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(2):473-
- 82.
349. Sun X, Ferguson HN, Hagerman AE. Conformation and Aggregation of Human Serum Albumin in the Presence of Green Tea Polyphenol (EGCg) and/or Palmitic Acid. *Biomolecules*. 2019;9(11).
350. Bae MJ, Ishii T, Minoda K, Kawada Y, Ichikawa T, Mori T, et al. Albumin stabilizes (-)-epigallocatechin gallate in human serum: binding capacity and antioxidant property. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(6):709-15.
351. Do GM, Kwon EY, Kim HJ, Jeon SM, Ha TY, Park T, et al. Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(1):55-9.
352. Hsu SP, Wu MS, Yang CC, Huang KC, Liou SY, Hsu SM, et al. Chronic green tea extract supplementation reduces hemodialysis-enhanced production of



- hydrogen peroxide and hypochlorous acid, atherosclerotic factors, and proinflammatory cytokines. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(5):1539-47.
353. Arunima S, Rajamohan T. Effect of virgin coconut oil enriched diet on the antioxidant status and paraoxonase 1 activity in ameliorating the oxidative stress in rats - a comparative study. *Food Funct.* 2013;4(9):1402-9.
354. Zhao J, Liu J, Pang X, Zhang X, Wang S, Wu D. Epigallocatechin-3-gallate inhibits angiotensin II-induced C-reactive protein generation through interfering with the AT1-ROS-ERK1/2 signaling pathway in hepatocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2016;389(11):1225-34.
355. Riegsecker S, Wiczynski D, Kaplan MJ, Ahmed S. Potential benefits of green tea polyphenol EGCG in the prevention and treatment of vascular inflammation in rheumatoid arthritis. *Life Sci.* 2013;93(8):307-12.