



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de los metabolitos de la vía de las kinureninas en suero y líquido cerebroespinal de pacientes mexicanos con Esclerosis Múltiple

TESIS

QUE ES PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Pablo Arturo Acosta Méndez

Dra. Verónica Pérez de la Cruz
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Dr. Diego González Halphen
Instituto de Fisiología Celular

Dr. José Pedraza Chaverrí
Facultad de Química

Ciudad de México, Enero, 2025



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

SINODALES DESIGNADOS
Presente

Estimado académico:

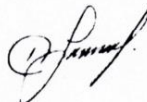
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **7 de noviembre de 2023**, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias** del/la estudiante **ACOSTA MÉNDEZ PABLO**, con la tesis **"Caracterización de los metabolitos de la vía de las kinureninas en suero y líquido cerebrospinal de pacientes mexicanos con Esclerosis Múltiple."**, dirigida por el/la Dr(a). **PEREZ DE LA CRUZ VERONICA**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

			ACEPTA	FECHA	FIRMA
GONSEBATT BONAPARTE MARÍA EUGENIA	PMDCBQ	PRESIDENTE	SI ☒ NO ☐	27 / 11 / 23	
OSORIO YÁÑEZ CITLALLI	PMDCBQ	SECRETARIO	SI ☒ NO ☐	24 / 11 / 23	
BERMUDEZ RATTONI FEDERICO	PMDCBQ	VOCAL	SI ☒ NO ☐	29 / 11 / 23	
GUERRA CRESPO MAGDALENA	PMDCBQ	VOCAL	SI ☒ NO ☐	28 / 11 / 23	
VALLE GARCÍA DAVID	PMDCBQ	VOCAL	SI ☒ NO ☐	23 / 11 / 23	

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 7 de noviembre de 2023



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: "Caracterización de los metabolitos de la vía de las kinureninas en suero y líquido cerebroespinal de pacientes mexicanos con Esclerosis Múltiple" que presenté para obtener el grado de Maestría en Ciencias Bioquímicas es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pablo Acosta'.

**Pablo Arturo Acosta Méndez
311129988**

Dedicatoria y agradecimientos

“La ciencia de la mente se basa en la idea de que todos los procesos mentales son biológicos y pueden entenderse en términos de las interacciones de las células nerviosas y las moléculas asociadas a ellas.”

Eric R. Kandel

A mi madre y a mi hermano, cuya fortaleza y amor incondicional han sido el faro que me ha guiado en este camino. Su apoyo constante y su fe en mis capacidades han sido la base sobre la cual he construido cada uno de mis logros.

A mi tutora, la Dra. Verónica Pérez de la Cruz, por su guía incansable, paciencia y visión científica, que no solo enriquecieron este trabajo, sino también mi formación como investigador.

Al Dr. Benjamín Pineda Olvera, por su disposición a compartir su conocimiento y por los valiosos aportes que marcaron un rumbo claro en este proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio, por su compañerismo, por las discusiones constructivas y por crear un ambiente donde la ciencia florece. Gracias a todos ustedes, este trabajo es el resultado de un esfuerzo compartido por comprender los fascinantes y complejos mecanismos que conectan lo genético, lo bioquímico y lo clínico, y en última instancia, a la vida misma.

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	7
1 Resumen	8
2 Introducción	9
2.1 Generalidades de Esclerosis Múltiple	9
2.2 Neurodegeneración en la Esclerosis Múltiple	10
2.3 Inflamación en la Esclerosis Múltiple	11
2.4 Excitotoxicidad por glutamato en Esclerosis Múltiple	12
2.5 Esclerosis Múltiple y la Vía de las Kinureninas	13
2.5.1 Vía de las kinureninas	15
2.7 Genética de la Vía de las Kinureninas en la Esclerosis Múltiple	16
3 Justificación	17
4 Hipótesis	18
5 Objetivos	19
5.1 Objetivo General	19
5.2 Objetivos específicos	19
6 Metodología	19
6.1 Diseño	19
6.2 Materiales	20
6.3 Métodos	21
7 Resultados	23
7.1 Resultados Clínicos	24
7.2 Resultados Bioquímicos	27
7.3 Resultados Inflamatorios	31
7.4 Resultados Genéticos	32

7.5 Modelado Molecular	34
8 Discusión	39
9 Perspectivas	49
10 Conclusiones	50
11 Referencias	51
Anexo	57

Abreviaturas

3-HK: 3-hidroxikinurenina

BOC: Bandas Oligoclonales

CIS: Síndrome Clínico Aislado

EM: Esclerosis Múltiple

EMP: Esclerosis Múltiple Progresiva

EMPT: Esclerosis Múltiple Progresiva con tratamiento

EMRRn: Esclerosis Múltiple naive sin tratamiento

IDO: Indolamina dioxigenasa

KYNA: Ácido kinurenico

K-S: Kolmogorov-Smirnov

K-W: Kruskal-Wallis

LCR: Líquido cefalorraquídeo

QUIN: Ácido quinolínico

RIS: Síndrome Radiológico Aislado

RMI: Resonancia Magnética Cerebral

TDO: Triptofano dioxigenasa

TME: Terapia Modificadora de la Enfermedad

VK: Vía de las kinureninas

1 Resumen

Introducción: La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica del sistema nervioso central, caracterizada por la desmielinización y daño axonal. Se manifiesta en diferentes formas clínicas como Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente (EMRR) y Esclerosis Múltiple Progresiva (EMP). Se sugiere un rol del microambiente inflamatorio en el daño axonal, excitotoxicidad mediada por glutamato y recientemente alteraciones en la vía de las kinureninas (VK) en la neurodegeneración de la EM. La VK es la principal vía de catabolismo del triptófano, incluye varios pasos enzimáticos que generan metabolitos neuroactivos con potencial implicación en la EM. Alteraciones en los niveles de metabolitos de esta vía podrían ser biomarcadores potenciales de la actividad de la enfermedad o su progresión; sin embargo, no existe una caracterización en pacientes con EM en población mexicana.

Objetivo: Determinar los niveles de los metabolitos derivados del catabolismo del triptófano a través de la VK en suero y líquido ceforraquídeo en pacientes mexicanos con EM.

Material y métodos: Se recabaron datos clínicos de 73 expedientes de pacientes con EM que contaban con muestras de suero y líquido ceforraquídeo (LCR) en el biobanco. Se analizaron muestras de 85 individuos: 12 individuos sanos, 23 pacientes sin diagnóstico de EM (no-EM), 25 pacientes EMRR sin tratamiento (EMRRn), 16 pacientes con EMP y 9 pacientes con EMP con tratamiento (EMPt). Se determinaron los metabolitos de la VK en muestras de suero y LCR por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de fluorescencia y electroquímico. Se empleó un Kit ELISA para el caso de los niveles de ácido quinolínico.

Resultados: En suero, los niveles del grupo sano fueron de 10.48 ± 2.47 fmol/uL de KYNA y 0.047 ± 0.01 pmol/uL de 3-HK. El grupo no-EM presentó 2.54 ± 1.5 fmol/uL de KYNA y 0.29 ± 0.03 ng/mL de QUIN en LCR. Para el grupo EMRRn, los niveles son 4.48 ± 1.09 fmol/uL de KYNA y 0.41 ± 0.18 pmol/uL de 3-HK en suero; en LCR 2.19 ± 0.85 fmol/uL de KYNA y 0.31 ± 0.03 ng/mL de QUIN en LCR. En el grupo EMP, los valores son 3.83 ± 0.80 fmol/uL de KYNA y 0.52 ± 0.08 pmol/uL de 3-HK en suero, y 0.73 ± 0.13 fmol/uL de KYNA y 0.29 ± 0.02 ng/mL de QUIN en LCR. El grupo EMTp tiene 2.52 ± 0.29 fmol/uL de KYNA y 0.73 ± 0.07 pmol/uL de 3-HK en suero, y 1.25 ± 0.53 fmol/uL de KYNA y 0.35 ± 0.03 ng/mL de QUIN en LCR.

Conclusiones: Los niveles de KYNA en suero de pacientes con EM se encuentran estadísticamente disminuidos ($p < 0.05$) respecto a personas sanas y pacientes no-EM. Los niveles de 3-HK en suero en pacientes con EM se encuentran incrementados ($p < 0.05$) respecto a individuos sanos.

Palabras clave: Esclerosis Múltiple Progresiva, Neurodegeneración, Vías de las Kinureninas.

2 Introducción

2.1 Generalidades de Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica, inflamatoria y desmielinizante que se caracteriza por daño en tiempos y localizaciones diferentes dentro del sistema nervioso central (SNC) lo que conduce al daño axonal y de la mielina¹. Produce episodios de disfunción neurológica con un curso variable de recuperación y progresión de la enfermedad. Los cursos clínicos de la EM son: Síndrome Radiológico Aislado (RIS) donde el paciente tiene lesiones en un estudio de imagen cerebral pero no tiene síntomas, Síndrome Clínico Aislado (CIS) donde el paciente tiene síntomas compatibles con EM pero en una sola ocasión, Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente (EMRR) la cual es un subtipo de la enfermedad caracterizado por episodios de actividad de la enfermedad y periodos sin actividad de la enfermedad, después de 10 a 15 años el 50% progresa a Esclerosis Múltiple Progresiva (EMP) en la cual ya no se distingue una progresión asociada a la actividad de la enfermedad, sino que hay un empeoramiento progresivo y continuo de los síntomas¹.

En el mundo existen alrededor de 2.3 millones de personas diagnosticadas. En México, existen cerca de 20 mil personas diagnosticadas y es la segunda causa de discapacidad en edades productivas². Los estudios epidemiológicos y de ancestría sugieren que la prevalencia, la edad media de aparición y los fenotipos específicos de la EM son diferentes en caucásicos y latinos³. Estudios epidemiológicos recientes indican un aumento en la prevalencia de EM en América Latina respecto a años anteriores, donde no existe el gradiente de latitud sur-norte descrito para los países nórdicos. El análisis de los aspectos epidemiológicos y específicos de la EM en América Latina sugiere que la susceptibilidad y el comportamiento clínico de la enfermedad están relacionados con mezclas de genes en la población. La prevalencia mundial por edad aumentó en un 10.4% entre 1990 y 2016^{3,4}.

El diagnóstico de la EM se basa en los criterios de diagnóstico de McDonald, que vinculan la manifestación clínica con lesiones características demostradas por imágenes de resonancia magnética (RMI), análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR), incluyendo bandas oligoclonales (BOC) y potenciales evocados visuales. Cabe resaltar que estos criterios fueron revisados por última vez en 2017 y modificados en los síndromes clínicos aislados con tendencia hacia un diagnóstico más temprano⁵.

Las opciones terapéuticas actuales para la EMP siguen siendo decepcionantes y desafiantes en comparación con los otros subtipos de EM. El retraso en el diagnóstico de

este subtipo de EM se debe a que suele ser retrospectivo, basado en antecedentes de empeoramiento neurológico gradual con o sin recaídas ocasionales, remisiones menores o periodos de inactividad⁶.

La patogenia precisa de la EM no está descrita, pero los mecanismos propuestos involucran procesos inmunes aberrantes, desencadenados por exposiciones ambientales, que conducen a daños agudos y a largo plazo. Estos procesos involucran linfocitos T, linfocitos B y mecanismos innatos en individuos genéticamente predispuestos. Ante un desencadenante existe una migración dentro del sistema nervioso central (SNC) de células inmunes activadas. Por lo anterior, se inician eventos patológicos que resultan en: desmielinización, degeneración neuroaxonal, pérdida sináptica, oligodendrogliopatía y astrogliosis. Los procesos inmunes pueden desempeñar un papel menor en la patogenia de la etapa progresiva de la EM; los mecanismos propuestos incluyen: cambios relacionados con la edad en el SNC lesionado, agregados linfoides meníngeos que median la inflamación intratecal secuestrada en curso y activación de la inmunidad innata del SNC (la microglía en particular)⁷.

2.2 Neurodegeneración en la Esclerosis Múltiple

La neurodegeneración es un proceso que implica la degeneración progresiva que lleva a muerte neuronal y es un factor común en diversas enfermedades neurológicas. Históricamente la clasificación de la EM se ha basado en observaciones que sugieren neurodegeneración secundaria a lesiones desmielinizantes inflamatorias recurrentes. Actualmente, se ha propuesto el concepto de RAW (empeoramiento asociado a la recaída) y PIRA (Progresión independiente de la actividad por recaída). Existen diversos marcadores de neurodegeneración en PIRA: Tomografía de Coherencia Óptica de la retina, evidencia el adelgazamiento de la capa de células ganglionares y la capa plexiforme interna, así como pérdida de células retinianas ganglionares⁸. Adicionalmente, el daño neuroaxonal y la astrogliosis elevan la concentración de neurofilamentos de cadena delgada en etapas tempranas de la neurodegeneración y durante las recaídas en pacientes con EM, por lo que predicen un empeoramiento clínico⁹.

En estudios post mortem de cerebros de pacientes con EM se evidenció histológicamente la presencia de transecciones axonales, así como pérdida y atrofia cerebral progresiva. Lo anterior sugiere que hubo un microambiente inflamatorio con liberación de sustancias que pueden dañar los axones, tales como enzimas proteolíticas, productos de procesos

oxidantes, y radicales libres producidos por células inmunes activadas como los linfocitos T CD8 autorreactivos y células gliales¹⁰.

En la EMP existe una estrecha asociación entre la inflamación y la neurodegeneración. La inflamación intratecal juega un rol hacia la neurodegeneración. La secuencia temporal exacta de estos eventos no está clara, pero sí está establecido que ambos procesos están involucrados en la progresión de la EM. Se han cuantificado diferentes células inflamatorias en autopsias de pacientes que tuvieron EM comparados con autopsias de controles. Se encontró desmielinización y neurodegeneración en las etapas progresivas de la enfermedad que tuvieron inflamación activa¹¹.

2.3 Inflamación en la Esclerosis Múltiple

En estudios de RMI cerebral se presentó reforzamiento al contraste de manera consistente en los pacientes con EM. Lo anterior se consideró un marcador de inflamación y de la ruptura de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, en EMP el reforzamiento deja de ser evidente, pero existe un deterioro clínico el cual se atribuye a la neurodegeneración¹².

En modelos experimentales de neuronas corticales primarias se han encontrado firmas de expresión de interferón- γ , el cual induce la fosforilación de STAT1. Tras su fosforilación, STAT1 es capaz de translocarse al núcleo celular como homodímero o heterodímero para unirse a regiones de regulación de genes estimulados por interferón- γ , lo que define una respuesta antiviral de esa célula caracterizada por el aumento en la expresión de IL-4. En un modelo murino con Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE) deficiente de IL-4, se observó más propensión a recaídas. Un comportamiento similar se encuentra en el mismo modelo, pero deficiente del receptor de IL-12, con un importante ambiente proinflamatorio¹³. Esta línea de investigación activa plantea que, bajo un estímulo crónico de la vía de interferón- γ , se produce una desregulación de la expresión de la IL-12 e IL-4, citocinas que atenúan la severidad de las exacerbaciones.

Se ha propuesto el modelo murino de enfermedad desmielinizante e inflamación con la deficiencia genética *AhR* en estado homocigoto del receptor de hidrocarburos de arilo en el cual se evidenció la elevación de las citocinas proinflamatorias en el nervio óptico que confirmaban la causalidad dependiente de la deficiencia de *AhR*¹⁴. Interesantemente, las regiones en las cuales la proteína se expresa normalmente coinciden con la localización neuroanatómica de las lesiones clásicas de EM las cuales son periventriculares, yuxtacorticales y en nervio óptico¹⁵.

En LCR de pacientes con EM se ha observado que las concentraciones de IL-17 e IL-4 incrementan. Lo anterior corresponde a una respuesta de células T CD4 Th17, mientras que la producción de IL-4 corresponde a células T CD4 Th2 y macrófagos¹⁶. Se estableció que en pacientes con EM naïve o de reciente diagnóstico se encuentra una correlación de las citocinas proinflamatorias y las lesiones en la RMI, así como con actividad de la enfermedad, sugiriendo que la inflamación podría estar involucrada en la patogénesis de la EM¹⁷.

2.4 Excitotoxicidad por glutamato en Esclerosis Múltiple

Dentro de un ambiente proinflamatorio en SNC, con una microglía activada, se agregan cambios en el medio de la matriz extracelular tales como acidosis, hipoxia local y desbalance iónico, causando la muerte neuronal. El principal proceso que conlleva a una mayor concentración de glutamato es la degeneración axonal con un escape de iones y neurotransmisores llevando a una hiperexcitabilidad y en consecuencia la excitotoxicidad. La alta concentración de glutamato extracelular activa los receptores de glutamato ionotrópicos, aumenta la entrada de calcio y promueve la muerte celular. La excitotoxicidad por glutamato en EM ha sido demostrada en modelos de EAE de modelos murinos tratados con NBQX (antagonista de receptor de glutamato AMPA/kainato)¹⁸. También se ha descrito que la deficiencia del canal TRPM4 en modelos murinos lleva a una protección contra la toxicidad por glutamato. Esto se debe a que la pérdida de función de TRPM4 permite que, de manera extra sináptica, la subunidad GluN2A y GluN2B interactúen físicamente con la proteína TRPM4 en el dominio TwinF. Esto forma un complejo NMDAR/TRPM4 que evita la excitotoxicidad mediada por NMDAR. Este fenómeno fue descrito en neuronas hipocámpales de ratón con coimmunoprecipitación¹⁹.

La sobrecarga de calcio secuestrada en la mitocondria lleva a despolarización de la membrana causando la disfunción mitocondrial y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno, promoviendo la peroxidación lipídica²⁰. La acidosis consecuencia de la inflamación y el alto consumo energético lleva a la activación de canales ASIC1 y NCX, lo cual también promueve la acumulación de calcio intracelular.

Adicionalmente, al comparar personas sanas y 25 pacientes con EM sometidos a RMI de 3 Teslas con contraste acoplada a espectroscopía, se evidenció un aumento en las concentraciones de glutamato en las lesiones agudas ubicadas en la sustancia blanca con reforzamiento contraste de los pacientes con EM²¹.

2.5 Esclerosis Múltiple y la Vía de las Kinureninas

En los últimos años, el catabolismo del triptófano a través de la vía de las kinureninas (VK) ha sido involucrado en las etapas tempranas de la EM y en modelos experimentales de esta enfermedad. Las enzimas de la VK se expresan en microglía y astrocitos²². Se ha demostrado que un ambiente proinflamatorio abundante de interferón- γ induce la expresión y actividad de la enzima indolamina dioxigenasa-1 (IDO-1), la cual es la primera enzima limitante de la VK²³. Se ha demostrado en líneas celulares de macrófagos murinos que el ácido picolínico, es un potente y selectivo inductor positivo de la expresión de las proteínas MIP-1 α y MIP-1 β , con un comportamiento dosis dependiente. Esta activación contribuye como un mecanismo de neurodegeneración que es característico de la EM²⁴.

En modelos murinos de EAE, Flanagan y colaboradores en 1995 encontraron que la relación Kinurenina / Triptófano está elevada ($K/T \geq 1$) y que además correlacionaba con el incremento en la severidad de la enfermedad²⁵. También se evidenció una mayor expresión y actividad de kinurenina 3-monoxigenasa (KMO) en la médula espinal de ratas con EAE. La actividad de KMO se encontró aumentada en médula espinal y se evidenció una elevación de ácido quinolínico (QUIN). La observación de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II y de iNOS los llevó a sugerir que la síntesis *de novo* de QUIN y 3-hidroxikinurenina (3-HK) ocurría en los macrófagos. Tras la administración de Ro 61-8048, un inhibidor selectivo de KMO, disminuyeron los niveles de QUIN, pero sin alcanzar significancia estadística²⁶. En líneas celulares de oligodendrocitos murinos N19 y N20.1 se demostró la captura de QUIN exógeno para catabolizarlo, la exposición a 1 mM de QUIN indujo muerte celular en oligodendrocitos en ratas²⁷. Se demostró en macrófagos de pacientes con EM que el INF- β indujo la biosíntesis de QUIN en 4922 nM dadas concentraciones de 50 UI/ml de INF- β después de 72 horas²⁸.

El aumento de la expresión y producción de citocinas Th1 e interferón- γ por linfocitos T incrementa la expresión de IDO. En etapas tempranas de la inducción de EAE se evidenció un incremento de kinurenina (KYN) debido a una mayor actividad de IDO. Se ha propuesto que la remisión clínica espontánea es por la actividad aumentada de IDO como un mecanismo de eliminación de células inflamatorias como los linfocitos T²⁹.

Desde 1979, en trabajos de Monaco y colaboradores se estableció que en pacientes con EM los niveles de triptófano están disminuidos tanto en suero como en LCR³⁰. En muestras de LCR de pacientes con EMRR los niveles de KYNA fueron disminuidos durante la

remisión de la enfermedad de por lo menos 2 meses contra niveles aumentados del mismo metabolito en la enfermedad activa^{31,32}. Por otra parte, en estudios realizados en pacientes con EMRR comparado con controles se evidenció una correlación con un valor de $r = 0.5$ estadísticamente significativo entre las mediciones en LCR de KYNA y S100B, un marcador de activación de astrocitos³³.

En un estudio adicional, se reportó que en pacientes que iniciaron tratamiento con INF- β los niveles de KYNA aumentaron por la inducción de IDO en esos pacientes; sin embargo, en pacientes con mayor duración de este tratamiento el efecto no se evidenció posiblemente por la sensibilización al medicamento y su mayor degradación. En los sujetos sanos las mediciones sugieren que el metabolismo del triptófano podría tener una regulación circadiana³⁴. Se ha reportado incremento de la actividad de las kinurenina aminotransferasas (KATs, enzimas encargadas de la producción de KYNA) en eritrocitos de pacientes con EM al compararlos con controles. La actividad de KAT-I respecto a KAT-II fue mayor³⁵. Existe evidencia que la VK está involucrada en la EM y otras enfermedades neurodegenerativas³⁶. Por trabajos de Aeiheband se sabe que cada subtipo de EM tiene un comportamiento distinto, siendo notable el incremento en la concentración de QUIN en pacientes con EMRR en las recaídas. En el mismo trabajo se dividieron los individuos controles en enfermedades inflamatorias y no inflamatorias teniendo una mejor comparación al subdividir el grupo control³⁷. En pacientes pediátricos con EM se asoció la elevación de KYNA en suero con una alta tasa de recaída³⁸. Bansi en 2018 reportó diferentes modificaciones en la VK ante el mismo ejercicio físico dependiendo del subtipo de EM³⁹.

De acuerdo con la revisión sistemática publicada en 2022 en la que incluyeron 10 estudios con diferentes mediciones de metabolitos de la VK y expresiones de los transcritos para las enzimas de la vía, se evidenció una posible conexión entre las alteraciones en los niveles de la VK y la EM. Especialmente, los niveles elevados de QUIN en EMPP que pudiese ser un potencial biomarcador de la fase de actividad de desmielinización⁴⁰.

Producto del estudio de la influencia de la VK en la EM, se desarrolló un fármaco cuya estructura es similar a KYNA llamado Laquinimod y Linomide cuya administración reduce la expresión de citocinas proinflamatorias por la inhibición de NF- $\kappa\beta$ por lo que polariza la respuesta inmune de Th1 a Th2 y Th17⁴¹. También se ha propuesto como una diana terapéutica la inhibición de IDO para los pacientes con EM⁴².

2.5.1 Vía de las kinureninas

La VK fue descrita desde 1947 como la responsable de la biosíntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺)⁴³. Actualmente sabemos que es la principal vía del catabolismo del triptófano (figura 1). El primer paso de la vía consiste en la escisión oxidativa de L-triptófano por la enzima triptófano dioxigenasa (TDO) para producir N-formil kinurenina. En el cerebro, esta reacción es llevada a cabo por la IDO. El segundo paso consiste en la degradación de N-formil kinurenina por la enzima kinurenina formamidasa en L-kinurenina (L-KYN). El tercer paso se divide en tres, debido a que L-KYN es sustrato de tres enzimas, las cuales son: kinureninasa que forma ácido antranílico; la kinurenina-3-hidroxilasa da lugar a 3-HK y las kinureninas aminotransferasas (KATs) la convierten de manera irreversible en ácido kinurénico (KYNA). La enzima KAT pertenece a la familia de enzimas dependientes de piridoxal, a la fecha se han reportado 4 isoformas desde KAT-1 a KAT-4. En el cerebro humano KAT-2 tiene un rol de producción de KYNA elevado (70%)⁴⁴.

La kinurenina-3-hidroxilasa, también conocida como KM es una reacción dependiente de NADPH. La kinurenasa está localizada en el citoplasma y es dependiente de piridoxal. El ácido antranílico y 3-HK se metabolizan al ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA).

Una vez producido el 3-HA sirve de sustrato de la enzima dioxigenasa 3-hidroxiantranilato (3-HAO) que abre su anillo para producir 2-amino-3-carboximuconato semialdehído el cual es un intermedio inestable.

El 2-amino-3-carboximuconato semialdehído puede ser transformado inmediatamente a QUIN, puede ser transformado a PA ó a Glutaril-CoA. Finalmente, QUIN sirve de sustrato para la enzima quinolinato fosforibosil transferasa (QPRT) para producir NAD⁺⁴⁵.

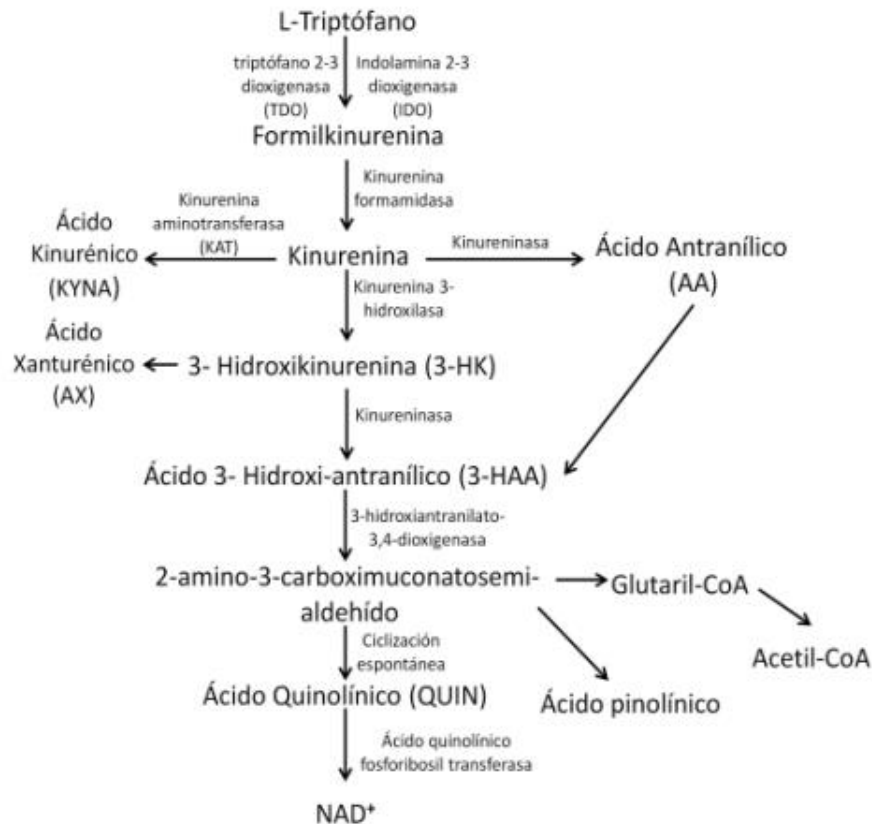


Figura 1. Representación de la vía de las kinureninas. Catabolismo del triptófano para la biosíntesis de NAD⁺

2.7 Genética de la Vía de las Kinureninas en la Esclerosis Múltiple

Poco se conoce de las implicaciones genéticas de la VK tanto fisiológica como patológicamente. En 2006 se asoció una variante de un solo nucleótido (SNV) en el gen que codifica a la enzima KMO en población japonesa con un Odds Ratio de 4 para riesgo de Esquizofrenia⁴⁶.

En 2009 después de realizar un análisis de ligamiento en familias con EM se encontró en regiones no HLA un desequilibrio de ligamiento en la región 1q43. Dentro de las variantes que se encontraron resaltaron las variantes NC_000001.11:g.241592265T>C y NC_000001.11:g.241595329A>G en la región 3' UTR del gen *KMO*⁴⁷. Se describió una SNV asociada con depresión moderada a severa y una mejor respuesta a citalopram en *IDO2* NC_000008.10:g.39901797A>C⁴⁸.

3 Justificación

La EM es la principal causa de discapacidad no traumática en la población productiva. De acuerdo con datos del INEGI 2018, en México el 6.4% de la población vive con discapacidad y el 38.5% fue por enfermedad. De acuerdo con los datos públicos se estima que un 0.32% de las personas con discapacidad se deben a EM. La EM es la segunda causa de discapacidad en población productiva en México sólo después de accidentes de tránsito terrestre. Es una enfermedad crónica-degenerativa incurable de causa desconocida y de difícil diagnóstico. Existen alrededor de 2.5 millones de personas diagnosticadas en el mundo. En México por lo menos 20 mil pacientes han sido diagnosticados y reportados en la literatura².

Las etnias latinoamericanas están asociadas con un inicio más temprano y un curso más grave de la EM en comparación con los estadounidenses blancos². El 59% de los pacientes con EMP requieren asistencia unilateral para caminar dentro de los 10 años posteriores al diagnóstico⁴⁹. Los pacientes sin progresión y sin discapacidad o con una discapacidad limitada después de 10 años aún pueden tener un riesgo significativo de progresión de la EM⁵⁰.

La caracterización del catabolismo del triptófano en pacientes mexicanos con EM abrirá nuevas rutas de investigación en busca de la identificación objetiva y temprana de biomarcadores para pacientes con EMP, lo cual en un futuro mejorará la toma de decisiones sobre el tratamiento.

4 Hipótesis

El perfil de los metabolitos de la VK en los pacientes con EM será diferente al de los sujetos sanos y los pacientes no-EM.

5 Objetivos

5.1 Objetivo General

Determinar los niveles de los metabolitos derivados del catabolismo del triptófano a través de la VK en suero y LCR en pacientes mexicanos con EM.

5.2 Objetivos específicos

- Recolectar datos clínicos a partir de expedientes clínicos y procesar 85 muestras clínicas
- Cuantificar KYNA suero y LCR
- Cuantificar 3-HK en suero
- Cuantificar QUIN en LCR
- Cuantificar citocinas en LCR de pacientes con EM
- Identificar variantes genéticas que codifican a proteínas del metabolismo del triptófano en pacientes con Esclerosis Múltiple
- Identificar variantes genéticas que codifican a proteínas del metabolismo del triptófano en pacientes mexicanos con fenotipo neurológico
- Predecir estructuras tridimensionales de proteínas con variantes genéticas de cambio de sentido de pacientes mexicanos con fenotipo neurológico
- Modelar la predicción de estructura tridimensional de proteínas con variante genética

6 Metodología

6.1 Diseño

Se realizó un estudio de casos y controles transversal descriptivo retrolectivo de pacientes con diagnóstico de EM con muestras y expedientes del año 2016 a 2017 considerando

ambos sexos desde 18 a 60 años. Folio de registro 121/22. Aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN). La selección de los pacientes fue a disponibilidad de muestra en un biobanco del laboratorio de neuroinmunología.

Criterios de inclusión para controles de suero

Voluntarios sanos

Pacientes con muestra en biobanco de LCR y de suero

Criterios de inclusión para controles con muestra LCR

Pacientes con muestra de suero y/o LCR en biobanco

Criterios de inclusión para casos de EM

Paciente con expediente en INNN

Paciente con muestra de suero y LCR en biobanco

Criterios de exclusión para casos de EM

Ausencia de expediente clínico en INNN

Ausencia de muestra de suero y LCR en biobanco

Análisis Bioinformático de Secuenciación de Exoma Completo (WES)

Criterio de inclusión: Pacientes con WES y EM en Sequence Read Archive (SRA) del NCBI. Datos públicos, pareados.

Análisis Bioinformático de base de datos mexicana con fenotipo neurológico

Criterio de inclusión: Variantes genéticas en mexicanos en genes que codifican proteínas del metabolismo del triptófano

Predicción de estructura tridimensional

Criterio de inclusión: Variantes genéticas de cambio de sentido en gen codificante a proteínas que participan en el metabolismo del triptófano

Criterio de exclusión: Variantes intrónicas ó intergenicas

6.2 Materiales

Muestras de suero y LCR: Se utilizaron muestras de pacientes con EM del Biobanco del del INNNMVS.

Datos clínicos: Se recabaron los siguientes datos clínicos como número de registro, sexo, edad, fecha de nacimiento, nivel socioeconómico, escolaridad, origen y residencia, diagnóstico clínico, inicio de padecimiento actual, edad de inicio, fecha de diagnóstico, edad de diagnóstico, tiempo de evolución, escala de discapacidad extendida (EDSS), número de brotes, presencia o ausencia de bandas oligoclonales, tratamientos previos y tratamiento actual.

Análisis bioinformático: Se obtuvieron WES en archivos fasta de secuenciación pareada de la base de SRA. Variantes genéticas en pacientes mexicanos con fenotipo neurológico que incluyen diagnósticos de movimientos anormales, epilepsia, demencia, discapacidad intelectual entre otros.

6.3 Métodos

Recolección de datos clínicos: Se solicitó por medio de una lista con los números de registro de los pacientes los expedientes físicos a archivo. Autorizado con consentimiento informado y aprobado por el comité de ética.

Procesamiento de muestras: Se tomaron 100 microlitros de suero de la muestra problema, se agregaron 100 microlitros de ácido perclórico al 6% y se centrifugaron a 4°C a 13,500 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos (min). Una vez centrifugada la muestra procesada se obtuvo el sobrenadante y se colocó un volumen final de 100 microlitros en un vial.

De las muestras de LCR recibidas se tomaron 100 microlitros y se agregaron 14 microlitros de ácido perclórico al 6% se centrifugó a 4°C a 13,500 rpm durante 20 minutos. Una vez centrifugada la muestra procesada se obtuvo el sobrenadante. Se colocaron 100 microlitros en un vial para ser analizado en el HPLC.

Determinación de los metabolitos de la VK: Las muestras fueron tratadas con HClO_4 6% (1:1) y centrifugadas por 20 min a 20,000 x g. Los sobrenadantes fueron analizados por HPLC utilizando una columna C18 fase reversa (80 X 4.6 mm, Thermo Scientific) e isocráticamente eluidos usando una fase móvil que contiene 250 mM acetato de zinc, 50 mM acetato de sodio y 3% acetonitrilo (pH 6.2), con un flujo de 1 ml/min y detector de fluorescencia (S200; Perkin Elmer, Beaconsfield, UK). KYNA fue detectado a 344 nm de excitación y 398 nm de emisión (tiempo de retención de 8 min) Se procesaron con el método previo las muestras para KYNA. Se analizó Trp a 246 nm excitación y 398 nm de emisión⁵¹.

La detección de 3-HK se realizó en las mismas condiciones, con un detector electroquímico UV PDA Perkin Elmer con una longitud de onda de 238 nm.

Para la determinación de QUIN en LCR las muestras fueron tratadas utilizando el Kit ELISA QUIN (OKCD02284, Lote# BJ09132021, Aviva Systems Biology). Los componentes del kit se almacenaron a -20°C hasta su uso. Los estándares de QUIN se reconstituyeron y diluyeron seriadamente para obtener concentraciones de 100, 33.33, 11.11, 3.7 y 1.23 ng/mL. Se preparó el Complejo QA-Biotina 1x y el Conjugado Avidina-HRP 1x mediante diluciones específicas. El Buffer de Lavado 1x se preparó diluyendo el Buffer de Lavado 30x en agua ultrapura. Para el ensayo, se añadieron 50 µL de estándares, muestras o blanco a los pocillos de la microplaca, seguido de 50 µL del Complejo QA-Biotina 1x. Tras incubar a 37°C durante 60 minutos y lavar cuatro veces, se añadió el Conjugado Avidina-HRP 1x y se incubó nuevamente. Después de lavar cinco veces, se añadió Sustrato TMB, se incubó en la oscuridad y se detuvo la reacción con Solución de Parada. La absorbancia se midió a 540 y 450 nm utilizando un lector de microplacas⁵².

Determinación de citocinas en LCR: Se utilizó el Kit de BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine (Catálogo No. 560484, BD Biosciences). Los componentes del kit se almacenaron a 4°C hasta su uso. Los estándares de citoquinas se reconstituyeron y diluyeron seriadamente para obtener concentraciones de 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156, 80, 40 y 20 pg/mL. Se prepararon las beads de captura mezclando los reactivos específicos de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e IL-17A en proporciones iguales. El Buffer de Lavado 1x se preparó diluyendo el Buffer de Lavado 10x en agua ultrapura. Para el ensayo, se añadieron 50 µL de estándares, muestras o blanco a los tubos de ensayo, seguido de 50 µL del reactivo de detección PE de citoquinas Human Th1/Th2/Th17. Tras incubar a temperatura ambiente durante 3 horas y lavar una vez, se añadió 1 mL de Buffer de Lavado 1x y se centrifugó. Después de aspirar el sobrenadante y resuspender en 300 µL de Buffer de Lavado 1x, las muestras se adquirieron utilizando un citómetro de flujo. Los datos se analizaron con el software FCAP Array para cuantificar las concentraciones de citocinas⁵³.

Análisis bioinformático: Se obtuvieron archivos fasta de los experimentos SRP124937 y SRP199159. Se realizó control de calidad y el preprocesamiento de las secuencias utilizando la herramienta FastQC v0.12.1. Las secuencias se alinearon con el genoma de referencia GRCh38 en BWA v0.7.17. Se alinearon los archivos SAM/BAM con Samtools

v.1.19.2. El llamado de variantes se utilizó GATK v.4.5.0.0 HaplotypeCaller. Finalmente, las variantes se anotaron con GATK v.4.5.0.0 VariantAnnotator y Funcotator. Las variantes obtenidas fueron filtradas en aquellas que tuvieran Fracción de la Variante mayor a 40 y profundidad mayor a 20.

Se analizaron los genes que codifican proteínas del metabolismo del triptófano: *AADAT*, *ACMDS*, *AFMID*, *ARNT*, *DDC*, *GOT2*, *HAAO*, *IDO1*, *IDO2*, *KMO*, *KYAT1*, *KYAT3*, *KYNU*, *MAO*, *QPRT*, *SLC36A4*, *SLC3A2*, *SLC7A5*, *TDO2*, *TPH1*, *TPH2*, *WARS*, *WARS2*.

Predicción de estructura tridimensional de proteínas: Dada la secuencia de la proteína con cambio de aminoácido con algoritmo de Deep Learning llamado AlphaFold3 se predijo la Estructura tridimensional tomando el modelo con mejor Ranking.

Análisis estadístico: La significancia estadística fue calculada con Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn, con *GraphPad Prism v.8.0.2*. La significancia estadística fue considerada en una $p < 0.05$.

7 Resultados

Lo primero que realizamos fue identificar las muestras de LCR disponibles en el biobanco del INNN. Identificamos muestras de LCR pacientes diagnosticados con EM y de pacientes

no-EM. Del total de 90 muestras, se seleccionaron 73 dado que son los pacientes que tenían información en expediente clínico disponible.

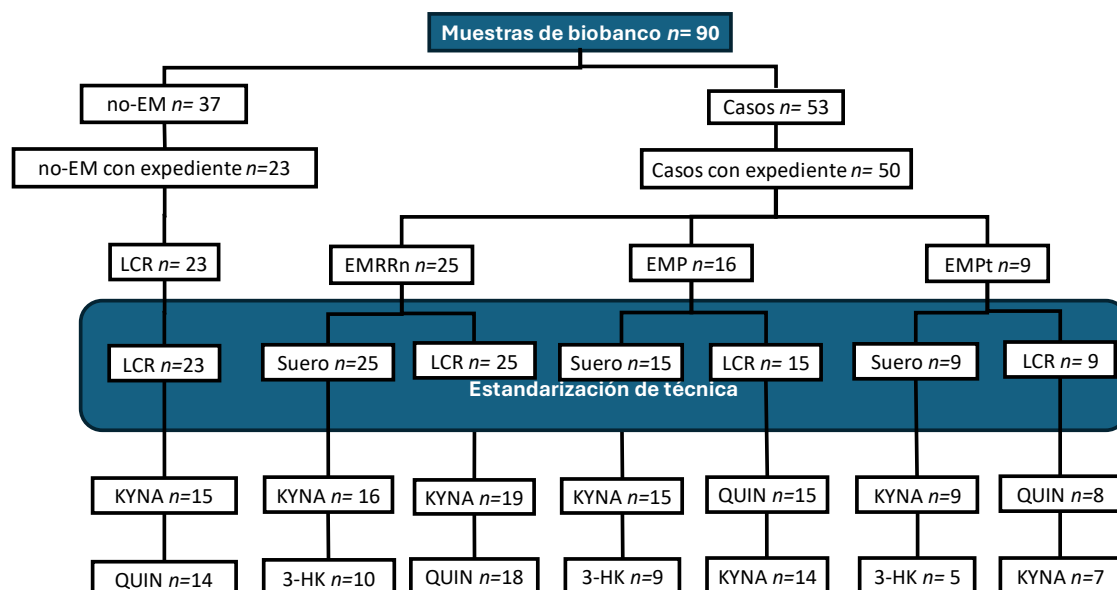


Figura 2. Diagrama de flujo de procesamiento de muestras de suero y LCR

Al contemplar los controles sanos se analizó un total de 85 individuos, los cuales fueron distribuidos en cinco grupos distintos. El primer grupo, denominado sanos, consistió en 12 voluntarios sanos menores de 30 años con una relación 1:1 masculino:femenino los cuales aportaron muestra de suero. El segundo grupo, consistió en 23 pacientes con diagnósticos no-EM. El tercer grupo incluyó 25 pacientes con un diagnóstico reciente de EM y sin tratamiento previo conocidos como pacientes naive (EMRRn). El cuarto grupo fue de 16 pacientes con una forma progresiva de la enfermedad sin haber recibido tratamiento al momento de la muestra (EMP). Finalmente, un grupo aparte compuesto de 9 pacientes con enfermedad progresiva quienes al momento de la toma de muestra habían recibido tratamiento (EMPt).

7.1 Resultados Clínicos

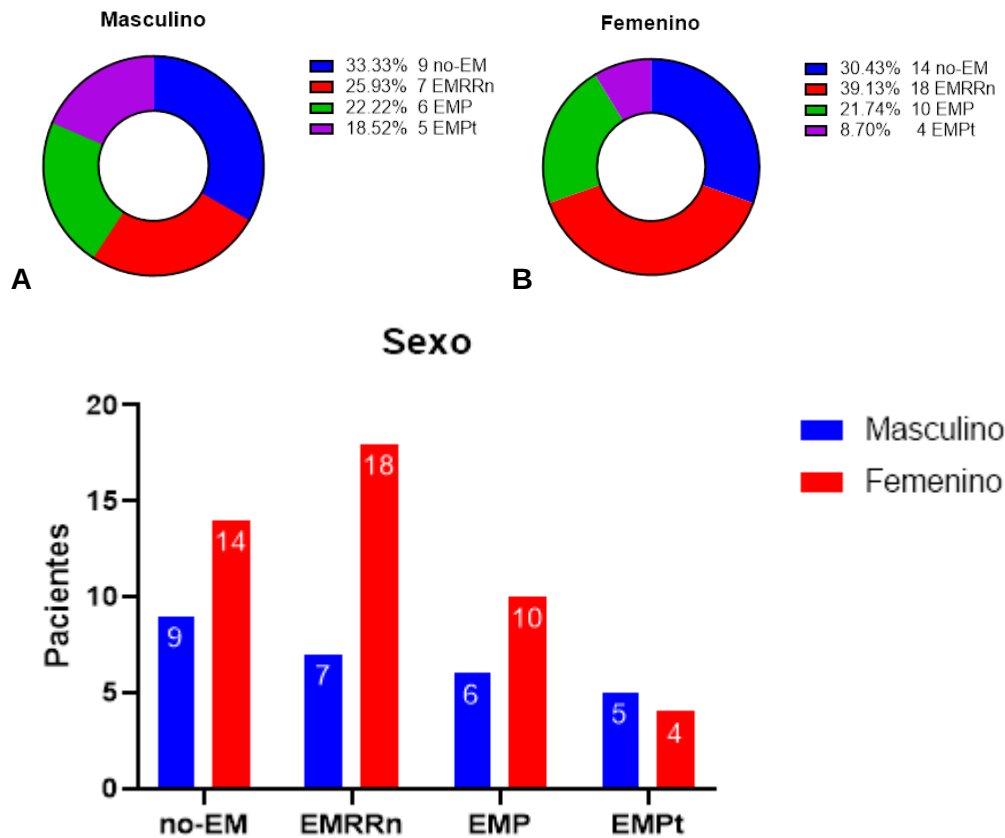


Figura 3. Número de pacientes por sexo en cada grupo estudiado. A: Sexo Masculino representado en porcentaje por subtipo de EM. B: Sexo Femenino representado en porcentaje por subtipo de EM. C: Los datos son representados por gráfico de barras de acuerdo con variable de sexo masculino y femenino. La n total fue 73 de 27 pacientes masculinos y 46 pacientes femeninos.

Después, caracterizamos la muestra de pacientes por sexo, en la figura 3 en el grupo no-EM hubo una frecuencia de 14 pacientes femeninos y 9 masculinos, en el grupo EMRRn la frecuencia de 18 pacientes femeninos es predominante sobre la frecuencia de 7 masculinos. En EMP fue conformado por 9 pacientes femeninos y 6 masculinos. Finalmente, el grupo de EMPt tuvo 3 pacientes femeninos y 5 masculinos.

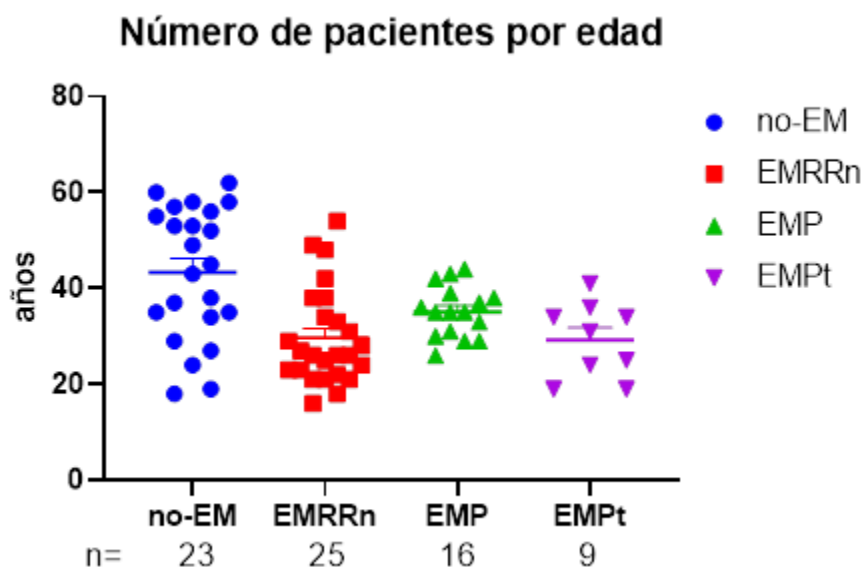


Figura 4. Número de pacientes por edades por cada grupo estudiado. Los datos se representan por valores independientes para cada muestra y la línea representa la mediana. La n total fue de 73 pacientes.

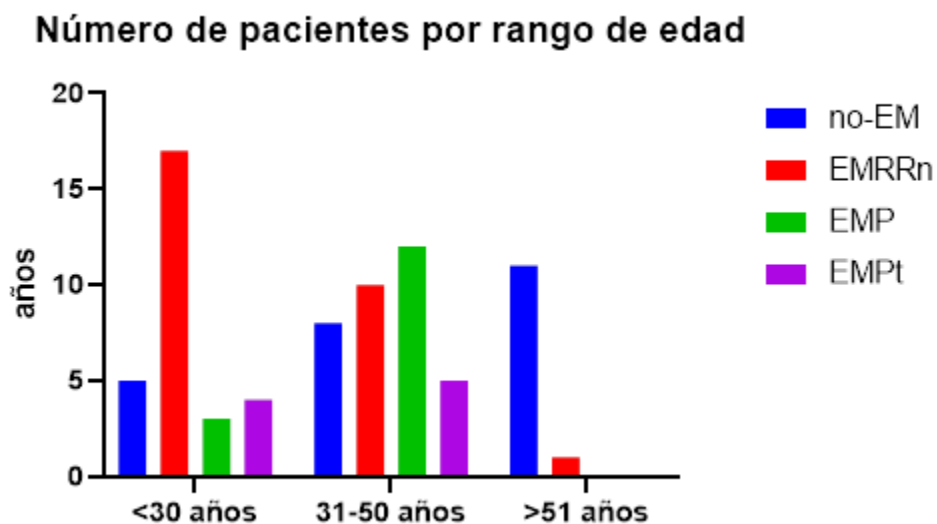


Figura 5. Número de pacientes en tres rangos de edad: menor de 30 años, de 31 a 50 años y mayores de 51 años. Se representa cada grupo estudiado en gráfico de barras por cada paciente por rango de edad. La n total fue de 73 pacientes.

Posteriormente, se describió la distribución por edades de los 4 grupos. La edad promedio del grupo no-EM fue de 43.35 ± 2.88 años y en EMRRn la edad promedio fue de 29.72

± 2.01 . En el grupo EMP la edad promedio fue de 35.13 ± 1.32 años y en EMPt fue de 29.22 ± 2.60 años, tal como podemos observar en la figura 4. El rango edad más frecuente en el grupo de controles fue en mayores de 51 años y para el grupo de EMRRn fue de menores de 30 años. Los grupos de las formas progresivas de la enfermedad se concentraron en el grupo de 31 a 50 años.

7.2 Resultados Bioquímicos

Una vez que se caracterizó la muestra total por diagnóstico clínico y edad proseguimos con la caracterización bioquímica con la determinación de los metabolitos de la VK la cual se puede dividir en dos principales ramas una que termina con la síntesis de KYNA asociada a acciones antiinflamatorias y la otra con la biosíntesis de NAD^+ pero con metabolitos intermedios neuroactivos. A nivel periférico se determinaron las concentraciones de KYNA y 3-HK en comparación con muestras de suero de personas sanas. A nivel de SNC se determinó KYNA y QUIN comparando con muestras de LCR de pacientes con diagnóstico no-EM. Al evaluar las concentraciones de KYNA en suero se encontraron disminuidos en los grupos con EM comparados con los individuos sanos de manera estadísticamente significativa.

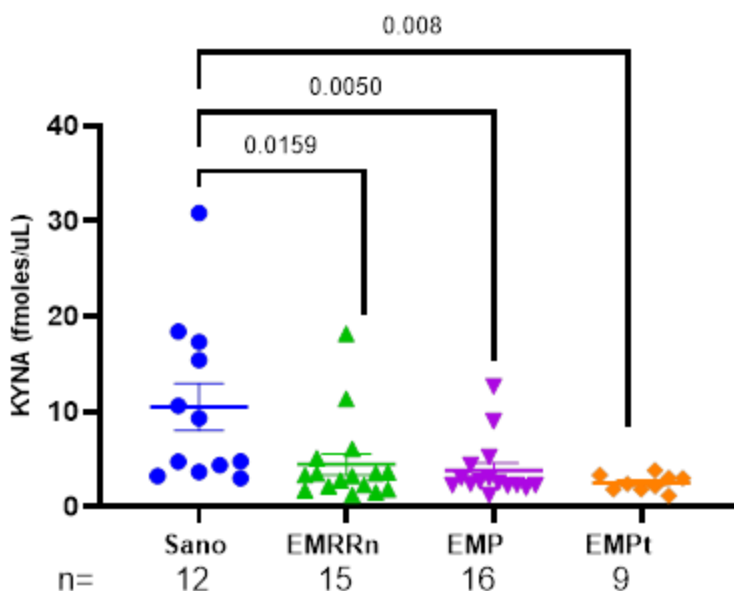


Figura 6. Determinación de los niveles de KYNA en suero en voluntarios sanos, pacientes con EMRRn, EMP y EMPt. Los datos son representados por los valores independientes para cada muestra y la línea representa la mediana. Se realizó una prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunns.

Como se muestra en la figura 6, los niveles de KYNA disminuyen en suero correspondiente al grupo EMRRn, EMP y EMPt al comprarlos con el grupo de voluntarios sanos. La reducción en los niveles de KYNA fue de un 40 a un 75 % comparado con el grupo de voluntarios sanos.

Continuando con la evaluación de segunda rama de la VK. La cantidad de muestras evaluadas disminuyó dado que esta medición fue realizada con el volumen de suero sobrante de la determinación de KYNA. Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar la concentración de 3-HK en suero entre los grupos con EMP y EMPt contra los individuos sanos. Sorprendentemente en los pacientes que sabemos fueron tratados antes de la fecha de toma de muestra tuvieron niveles elevados al comparar contra los individuos sanos.

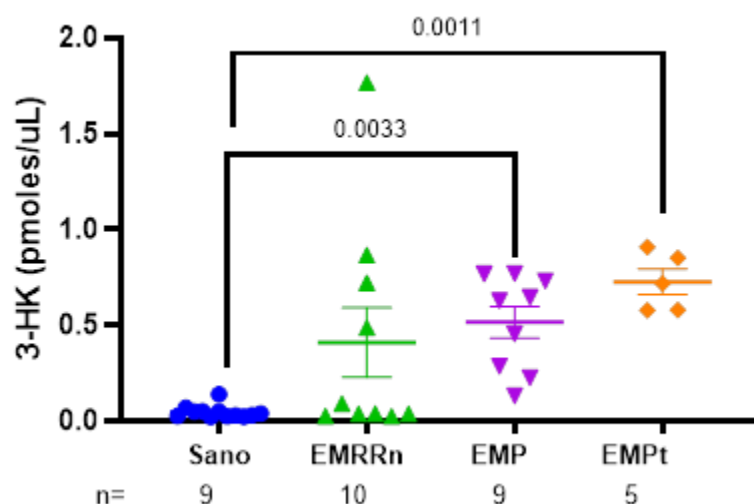


Figura 7. Determinación de los niveles de 3-HK en suero en voluntarios sanos, pacientes con EMRRn, EMP y EMPt. Los datos son representados por los valores independientes para cada muestra y la línea representa la mediana. Se realizó una prueba de Kruskal Wallis seguida de Dunn.

La concentración de 3-HK representada en la figura 7, evidenció una elevación en los niveles de 3-HK en todos los grupos de EM respecto a los voluntarios sanos; sin embargo, solo alcanzó significancia estadística en el grupo EMP ($p= 0.0033$) y en EMPt ($p=0.0011$). Hasta este punto fue posible evaluar los metabolitos de la VK de manera periférica en comparación con los controles sanos.

Continuamos con la evaluación de los metabolitos de la VK a nivel de SNC con la determinación de los niveles de KYNA en LCR. En esta comparación no se contó con LCR de personas sanas por lo que la comparación es con pacientes que no tenían diagnóstico de EM.

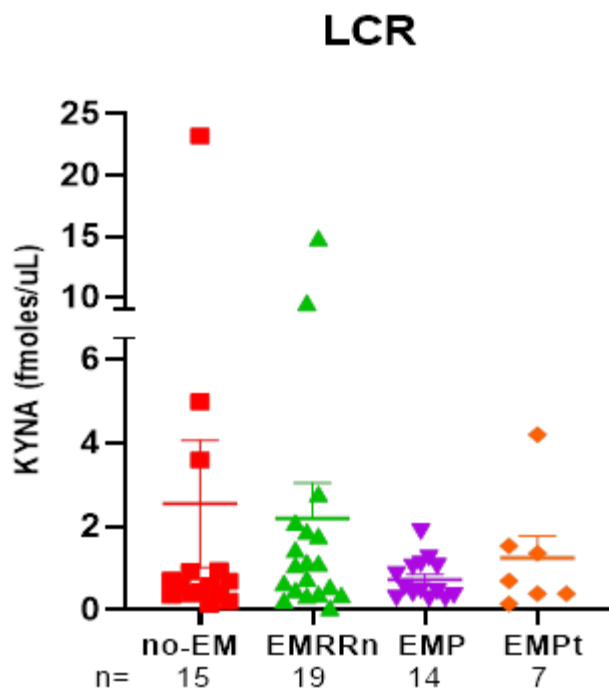


Figura 8. Determinación de los niveles de KYNA en LCR en pacientes control, pacientes con EMRRn, EMP y EMPt. Los datos son representados por los valores independientes para cada muestra y la línea representa la mediana. Se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov, seguido de un test de Kruskal-Wallis.

En el caso de los niveles de KYNA en LCR no se encontraron diferencias estadísticamente significativas; sin embargo, se puede observar una tendencia en los pacientes con enfermedad progresiva y enfermedad progresiva con tratamiento a una disminución en los niveles de KYNA respecto a los controles y la forma remitente recurrente. También se realizaron diversos análisis entre los grupos, incluso en segmentación por sexo y test de Kruskal-Wallis sin obtener p estadísticamente significativa.

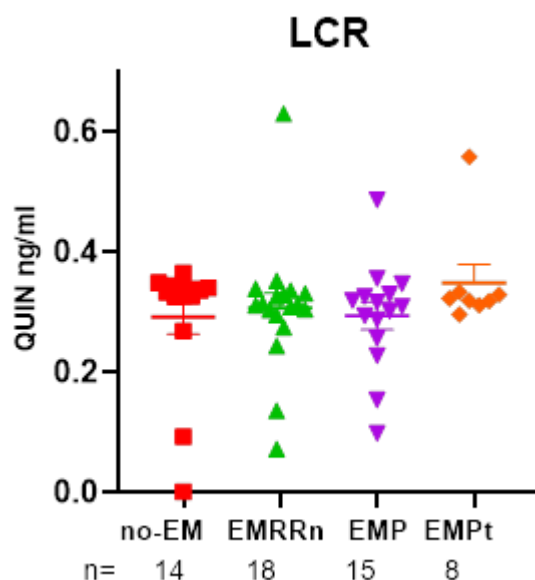


Figura 9. Determinación de los niveles de QUIN en LCR en pacientes control, pacientes con EMRRn, EMP y EMPt. Los datos son representados por los valores independientes para cada muestra y la línea representa la mediana. Se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov y test de Kruskal-Wallis

En la determinación de QUIN en LCR se realizó test de Kruskal-Wallis sin obtener p significativa. Se observó una disminución de las concentraciones de QUIN al comparar el grupo no-EM en comparación con el grupo con enfermedad progresiva sin tratamiento, pero sin alcanzar una p significativa. Cabe resaltar que esta comparación es con pacientes y no con individuos sanos lo cual puede influir en las diferencias significativas.

Tabla 2. Niveles de KYNA y 3-HK en suero, así como KYNA y QUIN en LCR en los diferentes grupos de estudio. Media $\pm$ SEM.				
Grupo	Suero		LCR	
	[KYNA] fmol/uL	[3-HK] pmol/uL	[KYNA] fmol/uL	[QUIN] nmol/uL
Sano	10.48 (± 2.47)	0.047 (± 0.01)	NC	NC
no-EM	NC	NC	2.54 (± 1.5)	0.29 (± 0.03)
EMRRn	4.48 (± 1.09) **	0.41 (± 0.18)	2.19 (± 0.85)	0.31 (± 0.03)
EMP	3.83 (± 0.80) **	0.52 (± 0.08)**	0.73 (± 0.13)	0.29 (± 0.02)

EMPt	2.52 (± 0.29) **	0.73 (± 0.07) **	1.25 (± 0.53)	0.35 (± 0.03)
Abreviaturas: NC no cuantificado. Diferencia estadísticamente significativa respecto a individuos sanos o no-EM: **				

En la tabla anterior se resumen las determinaciones de los metabolitos y la caracterización bioquímica de los diferentes subgrupos de pacientes con Esclerosis Múltiple en comparación con individuos sanos dentro de los posible y comparaciones con pacientes no-EM.

Dada la influencia de un ambiente proinflamatorio sobre la VK al inducir IDO y que en la EM una de las hipótesis más fuertes es una etiología autoinmune que se caracteriza por una inflamación constante a nivel de SNC, decidimos determinar los niveles de citocinas proinflamatorias en LCR.

7.3 Resultados Inflamatorios

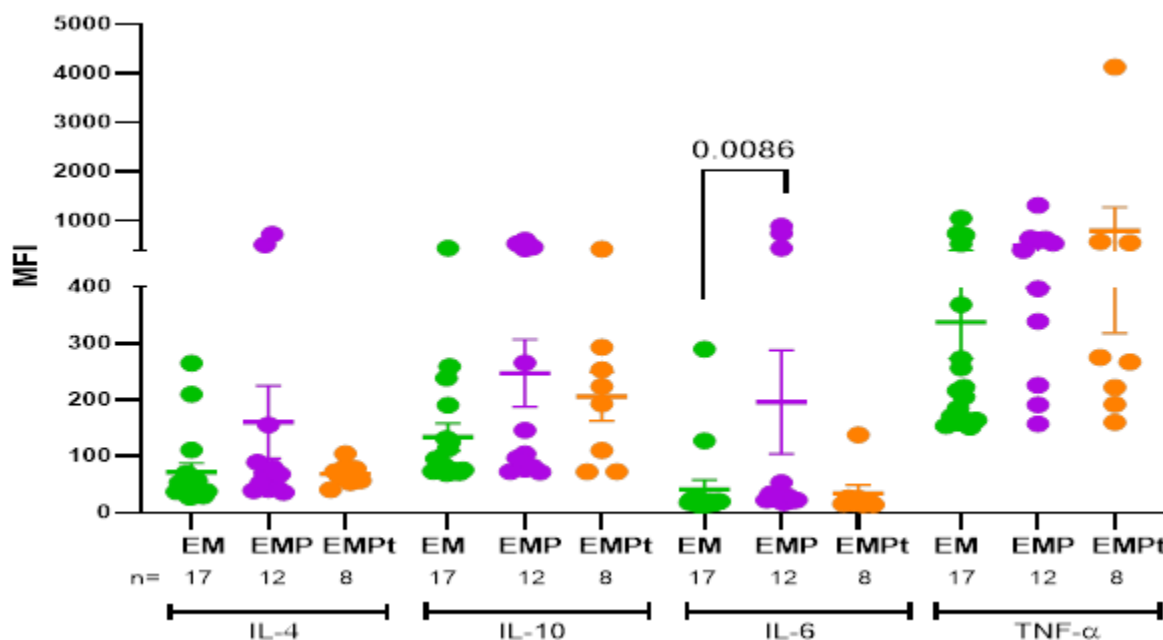


Figura 10. Perfil de citocinas en LCR de pacientes con Esclerosis múltiple (EMRR) y Esclerosis Múltiple progresiva (EMP). En azul se muestran valores independientes de pacientes con EMRR. En rojo se muestran valores independientes de mediciones en pacientes EMP. En líneas negras se muestra promedio de los valores.

Se cuantificó en LCR las citocinas antiinflamatorias: IL-4 e IL-10. Para las citocinas proinflamatorias se tomaron en cuenta la IL-6 y TNF- α (Figura 10). Se demostró significancia estadística al comparar el grupo EMP con EM en la medición de IL6 siendo incrementada en el primer grupo. Lo anterior no se replicó con los pacientes EMPt que pudieron estar influidos por el tratamiento; sin embargo, al comparar los niveles de TNF- α se observó una tendencia hacia la elevación tanto en el grupo EMP como en el grupo EMPt en comparación con el grupo EMRRn aun cuando no alcanzó la significancia estadística. Lo anterior sugiere que existe un ambiente proinflamatorio más pronunciado en el grupo de EMP e incluso en los tratados se mantiene una elevación de los niveles de TNF- α .

La compleja interacción entre la VK y un ambiente proinflamatorio en pacientes con EM ha revelado diferencias significativas en los metabolitos periféricos. Esto sugiere que podría haber variantes genéticas que, aunque sean frecuentes en la población en general, predisponen a los pacientes con EM a una forma progresiva de la enfermedad al modificar la VK en respuesta a la inflamación crónica. Para explorar esta posibilidad, decidimos investigar las variantes en genes relacionados con el metabolismo del triptófano, con el objetivo de caracterizar la presencia de variantes en el metabolismo del triptófano en pacientes con EM.

7.4 Resultados Genéticos

Una vez que habíamos analizado las alteraciones en los metabolitos de VK en sujetos con EM, analizamos las variantes en genes del metabolismo del triptófano en estudios de WES públicos de pacientes con EM. Usamos 14 archivos fasta de la base de datos SRA. Del experimento SRP124937 fue una familia en trío de origen Marroquí siendo el caso índice el hijo. SRP199159 fueron 3 familias italianas; La familia A un matrimonio no consanguíneo, en el cual el individuo I-1 fue diagnosticado con EMP a los 39 años con un EDSS de 6, el individuo I-2 femenino se reportó sana, en la descendencia el individuo II-3 un masculino con EMRR de inicio a los 36 años con EDSS de 1 y el individuo II-4 femenino con EMRR de inicio a los 31 años con EDSS de 1.5. La familia B un matrimonio no consanguíneo, el individuo I-1 masculino reportado como sano, el individuo I-2 femenino con EMRR de inicio a los 26 años con EDSS de 1.5, en la descendencia el individuo II-3 masculino con EMRR de inicio a los 24 años con EDSS de 1 y el individuo II-4 reportado como sano. La familia C un matrimonio no consanguíneo, el individuo I-1 masculino reportado como sano, el individuo I-2 femenino con EMRR de inicio a los 48 años con EDSS de 3 y el individuo II-3 un femenino con EMRR de inicio a los 35 años con EDSS de 4.

Se analizaron cuatro familias con 8 WES de casos con EM y 6 familiares sanos. Identificamos variantes genéticas relevantes que se encuentran en genes que codifican a proteínas del metabolismo del triptófano (Tabla 3) y de sus familiares sanos (Tabla 4). Posteriormente, consultamos la base de datos gnomAD v.4 para determinar la frecuencia alélica de las variantes genéticas. El resto de las variantes encontradas se encuentra adjuntas en el anexo.

Tabla 3. Variantes genéticas que codifican a enzimas asociadas al metabolismo del triptófano en pacientes con Esclerosis Múltiple						
Gen	Transcrito	Nucleótido	Aminoácido	gnomAD	Clasificación	n
<i>WARS2</i>	NM_015836.4	c.119G>A	p.G40D	0.000014	VUS	1
<i>KMO</i>	NM_003679.5	c.809+142C>T	NA	0.279851	VB	1
<i>DDC</i>	NM_001082971.2	c.49A>G	p.M17V	0.994400	VB	5
<i>AFMID</i>	NM_001010982.5	c.451C>T	p.R151W	0.063853	VB	2
Abreviaturas: Variante de Significado Incierto (VUS), Variante Benigna (VB).						

Para evaluar la presencia de estas variantes en controles sanos, analizamos los familiares sin EM. Fue notable encontrar dos variantes genéticas de sentido equivocado con baja frecuencia poblacional por lo que la clasificación clínica de esas variantes es de un significado incierto. La variante NM_003486.7:c.920C>T no está descrita con un fenotipo bien establecido, se ha asociado con autismo⁵⁴. La otra variante genética NM_015836.4:c.119G>A, se encuentra en el gen *WARS2* que tiene establecido el fenotipo de desorden del neurodesarrollo con un patrón de herencia autosómico recesivo⁵⁵.

Tabla 4. Variantes genéticas que codifican a enzimas asociadas al metabolismo del triptófano en familiares de pacientes con Esclerosis Múltiple						
Gen	Transcrito	Nucleótido	Aminoácido	gnomAD.v4	Clasificación	N
<i>SLC7A5</i>	NM_003486.7	c.920C>T	p.S307L	0.0001565	VUS	1

WARS2	NM_015836.	c.119G>A	p.G40D	0.0000142	VUS	1
4						
Abreviaturas: Variante de Significado Incierto (VUS), Variante Benigna (VB).						

Dados los hallazgos de la presencia de variantes genéticas en genes que codifican a proteínas del metabolismo del triptófano en pacientes con EM, decidimos explorar la frecuencia de este tipo de variantes en población mexicana. Para ello se analizó la base de datos de pacientes mexicanos del INMEGEN, seleccionando a aquellos con fenotipo neurológico, no EM. Seleccionamos las variantes genéticas más relevantes respecto a su efecto en la proteína y la literatura existente⁴⁶ (Tabla 5). Se consultó la base de datos gnomAD v.4 para saber la frecuencia alélica local en población indígena americana y en quienes no la tenían disponible fue tomada la frecuencia Admixture American.

La frecuencia poblacional de las variantes genéticas de la cohorte de pacientes con fenotipo neurológico del INMEGEN fue alta, lo que sugiere alta la probabilidad de que estas variantes estén presentes en los pacientes que determinamos las concentraciones bioquímicas de los metabolitos. Esto podría explicar la diferencia observada entre los pacientes con EMP y aquellos con EM. Un ejemplo notable es la variante en el gen *IDO2* el cual es inducible ante un ambiente proinflamatorio²⁹ y está descrita la disminución de la actividad enzimática en consecuencia de esta variante^{56,57}. Tanto en los pacientes con EM como en esta cohorte de población mexicana se encontró la variante en *KMO* reportada en asociación con Esquizofrenia⁴⁶ siendo de los pocos genes de la VK con un fenotipo asociado.

Tabla 5. Variantes genéticas que codifican a enzimas asociadas al metabolismo del triptófano en pacientes mexicanos con fenotipo neurológico.					
Gen	Transcrito	Nucleótido	Aminoácido	AD gnomAD v.4	Clasificación
<i>KYNU</i>	NM_003937.3	c.1234A>G	p.K412E	0.0879*	VB
<i>IDO2</i>	NM_194294.2	c.742C>T	p.R248W	0.4821*	VB
<i>KMO</i>	NM_003679.5	c.809+142C>T	NA	0.2683	VB
<i>DDC</i>	NM_000790.4	c.49A>G	p.M17V	0.9987	VB
Abreviaturas: Variante Benigna (VB). AD GnomAD v.4: Ancestría local de Admixed American. * Población indígena americana de la base pública gnomAD.					

7.5 Modelado Molecular

Dado que se encontró en pacientes mexicanos con fenotipo neurológico una variante genética de cambio de sentido no sinónimo en el gen codificante de *KYNU*, el cual está asociado con condiciones monogénicas^{58–63} con patrón de herencia autosómica recesiva

incluyendo la hidroxikinureninuria^{64,65}, decidimos predecir la estructura tridimensional de la proteína con el cambio K412E. Se alineó la estructura tridimensional de la proteína Wild Type (WT) y la predicción con la variante KYNU:p.K412E.

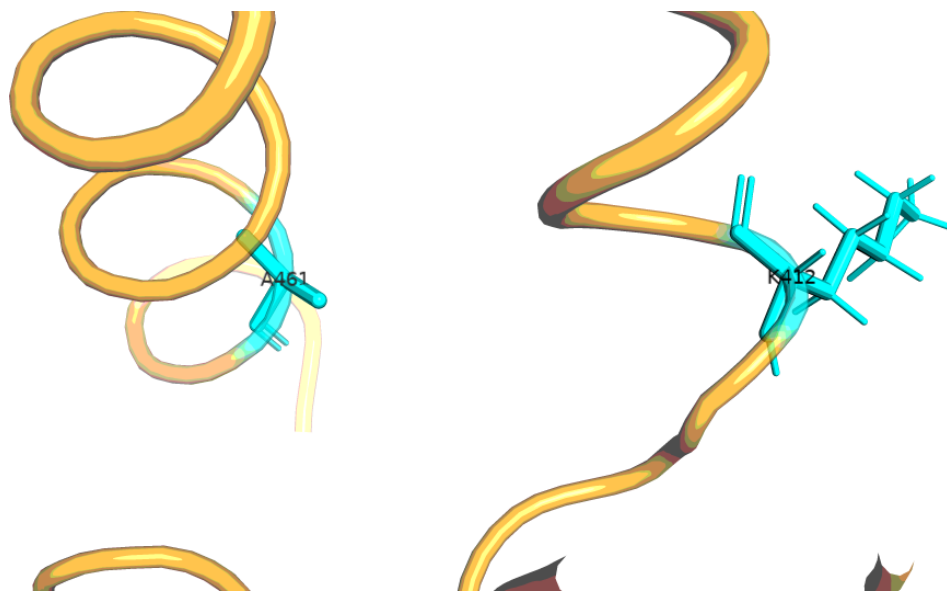


Figura 11. Representación de proteína KYNU WT con enfoque en aminoácido de K412 y A461

Dado que se encontró un cambio en la proximidad de la posición 412 con la posición 461 en la predicción al compararla con la WT se midió la distancia entre estas dos posiciones. Se encontró una distancia de 4 Å en la predicción de KYNU:p.K412E.

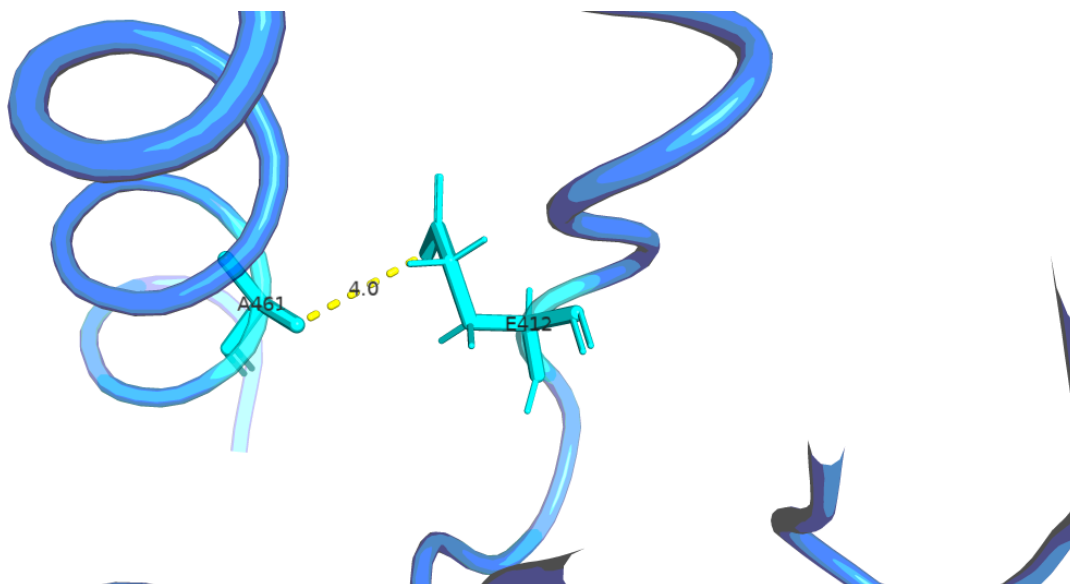


Figura 12. Representación de la predicción de la proteína KYNU con enfoque en posición de E412. Medición de la distancia de la posición 412 a la 461 medido en 4 Å representado con línea punteada en amarillo

Finalmente, respecto a esta variante genética en *KYNU* se representó el sobrelapamiento de las dos estructuras para evidenciar cómo la predicción tridimensional de KYNU con esta variante genera un cambio conformacional de la proteína.

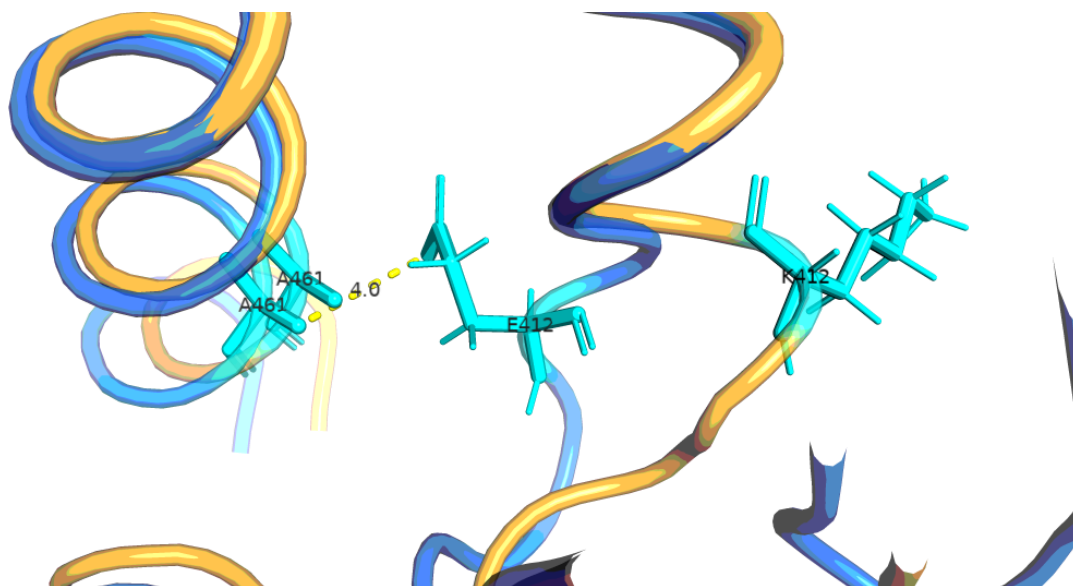


Figura 13. Representación del sobrelapamiento de la estructura tridimensional de proteína KYNU WT y la predicción de la proteína KYNU:p.K412E

Dado que se encontró en pacientes mexicanos con fenotipo neurológico una variante genética de cambio de sentido no sinónimo en el gen que codifica a la proteína IDO2. Se predijo la estructura tridimensional de la proteína IDO2 con el cambio de la R248W. Al realizar el modelado con grupo Hemo y la proteína IDO2 se identificaron los aminoácidos de interacción con el grupo Hemo en la proteína IDO2 WT sin encontrar entre ellos el residuo R248. La distancia de R248 respecto al grupo Hemo fue de 8.8 Å.

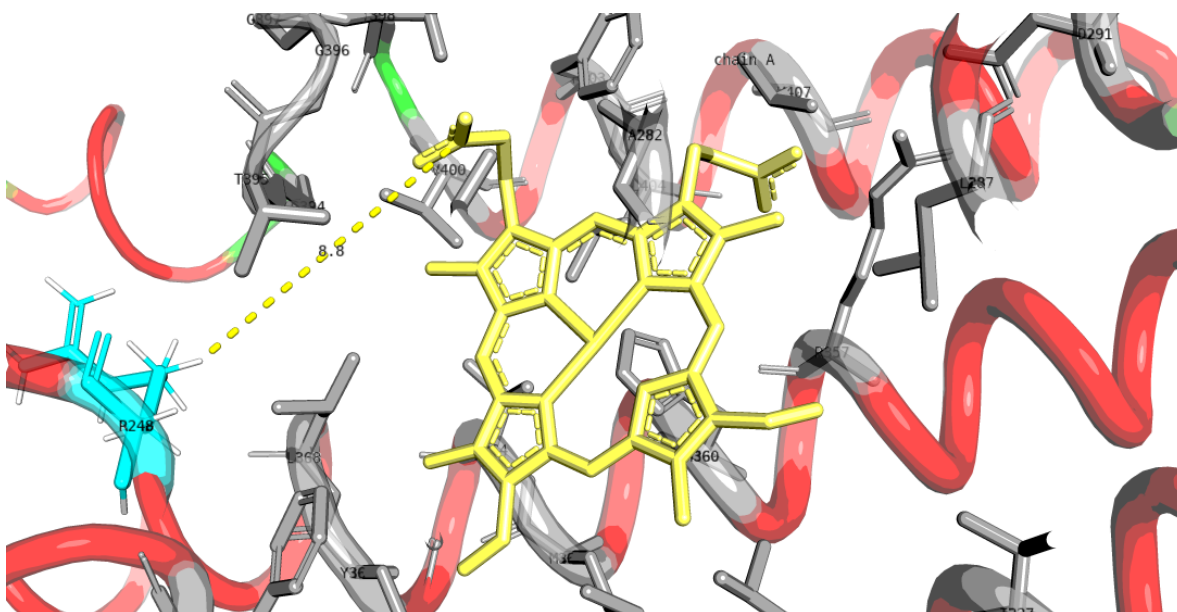


Figura 14. Representación de proteína IDO2 WT e interacción con el grupo Hemo. En gris se representan los aminoácidos que interactúan con grupo Hemo. Línea amarilla punteada: distancia entre R248 y grupo Hemo

Al comparar los aminoácidos que interactúan con el grupo Hemo en la proteína IDO2 WT y la proteína IDO2:p.R248W se evidenció que la R248 no interactúa con el grupo Hemo mientras que W248 probablemente lo hace ya que se encuentra 4.2 Å más cerca. Además, se identificó un cambio en la conformación de la beta plegada en la predicción de la proteína respecto a la WT.

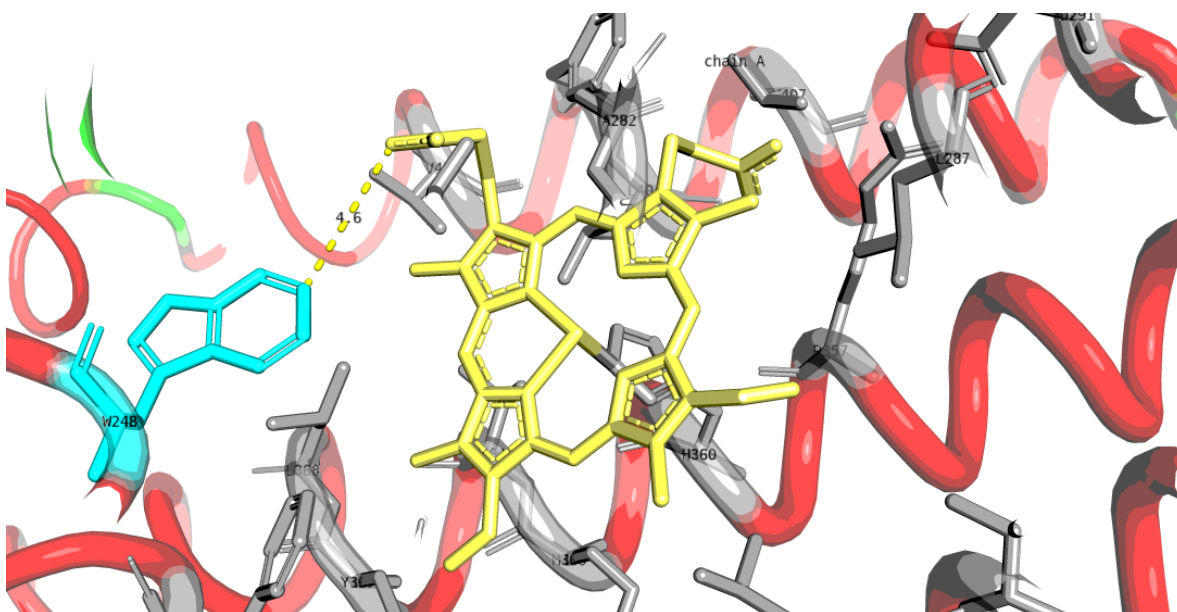


Figura 15. Predicción de proteína IDO2:p.R248W e interacción con grupo Hemo. En gris se representan aminoácidos que interactúan con grupo Hemo. Distancia entre W248 y grupo Hemo representado en línea amarilla punteada.

8 Discusión

Este es el primer estudio que evalúa los niveles de los metabolitos del catabolismo del triptófano en pacientes con EM mexicanos. Para llevar a cabo esta propuesta consideramos diversos grupos de estudio. A nivel periférico, es decir en muestras de suero, los grupos de estudio fueron: individuos sanos, EMRRn (aquellos pacientes con EM sin tratamiento), EMP (pacientes con EM progresiva sin tratamiento al momento de la toma de muestra) y EMPt (pacientes con EM progresiva tratados antes de la toma de la muestra). Mientras que cuando la muestra fue LCR se consideraron los siguientes grupos: no-EM (paciente con enfermedad neurológica diferente a EM, pero con sospecha de Fístula de LCR, hipertensión intracraneal benigna, miastenia gravis ocular, polineuropatía sensitivo axonal, quiste pineal, aneurisma de arteria cerebral media, carcinomatosis cerebral, demencia frontotemporal, encefalitis viral, meningitis bacteriana, neurocisticercosis, oligoastrocitoma, trauma craneoencefálico con paresia de VI nervio craneal, trastorno bipolar motivo por el cual se recolecto la muestra de LCR), EMRRn, EMP y EMPt.

Nuestro estudio coincide con la literatura en el rango de edad más frecuente que fue menor a los 30 años en el grupo de EMRRn. Así mismo se confirma la predominancia del sexo femenino en la frecuencia de casos en el grupo de EMRRn en concordancia con la literatura. Este hallazgo refuerza la teoría de que la influencia del sexo juega un papel importante en la EM¹. El rango de edad más frecuente en el grupo control activo fue en mayores de 50 años, esto debido a que los padecimientos que justifican realizar una punción lumbar por otras patologías que no sean EM son de edad de presentación más avanzada. Por ejemplo, en el abordaje de un paciente con probable demencia, se realiza punción lumbar, y esta patología suele aparecer en personas de aproximadamente 65 años⁶⁶.

En los últimos años, ha incrementado el número de publicaciones respecto a la VK y su relación con la EM. De 2019 a 2023 existen 54 publicaciones relacionadas en la base de datos de Pubmed, mientras que desde 1945 a 2018 existen 45 publicaciones. Lo anterior es con los términos de búsqueda “multiple sclerosis” and “kynurenine pathway”. Cabe resaltar que no se obtiene resultado al agregar latinoamerican, mexican ó Mexico. Se sabe que en comparación a poblaciones caucásicas en donde es frecuente esta enfermedad, los mexicanos somos una población con un componente genético diferente a otras poblaciones debido al mestizaje³. Por lo que es esperado que el comportamiento de la VK en los pacientes con EM mexicanos sea diferente al de otras poblaciones.

Dentro de las primeras publicaciones con interés por describir la relación de la VK con EM fueron: el trabajo publicado en 2017 por Guillemín y colaboradores, realizado en una población australiana y norteamericana, describió los niveles séricos de los metabolitos de las kinureninas predominantemente en mujeres con EM. En este se buscaba un enfoque importante en la forma progresiva de la EM y como la VK se ve influenciada en un ambiente proinflamatorio a una mayor actividad enzimática de IDO. Tal estudio estuvo compuesto por tres cohortes con un total de 103 EMRR y 72 EMP con 54 controles sanos. Las muestras analizadas fueron de suero en la mayoría de los casos, solamente en la cohorte 3 con 6 casos de EMRR y 14 de EMP se contaba con LCR. Al comparar los niveles de QUIN de los controles sanos contra todos los subgrupos de EM; los niveles de QUIN en EM fueron incrementados. En los pacientes con EMP se reportó la concentración de KYNA en 50 nM y de QUIN entre 600 nM y 750 nM. En el grupo de EMRR se reportó KYNA de 60 nM, QUIN 400 nM. No se reportaron niveles de 3-HK⁶⁷.

En la literatura existen 4 estudios respecto a los niveles periféricos de KYNA en la EM en los cuales solo uno incluyó suero y LCR^{34,35,68,69}. En 2005, Amirkhani reportó en 8 personas sanas con edad promedio de 33 años y en pacientes con EM tratados con interferón beta niveles de KYNA de 22 ± 3.1 nM. En los pacientes sanos se encontró que el índice K/T disminuyó 4 horas después de la medición basal a las 8 a.m, por lo que se sugiere un comportamiento circadiano. Hubo una diferencia estadísticamente significativa al comparar el índice K/T basal de los controles sanos tanto con los pacientes con EM tratados con INF por primera vez como los que tenían un uso crónico de este tratamiento³⁴. En 2005, se estudiaron a 6 hombres y 8 mujeres con EMRR con actividad de la enfermedad y un EDSS promedio de 3 comparando con 14 voluntarios sanos (5 hombres y 9 mujeres). Este estudio evidenció un aumento en los niveles de KYNA en los pacientes (77.12 ± 5.9 nM) comparado con los sujetos sanos (45.12 ± 6.3 nM)³⁵. En 2019, el estudio realizado por Tomosi en mujeres húngaras con diagnóstico de EMRR de dos años de seguimiento clínico analizó 20 muestras séricas y de LCR. Tomaron en cuenta 14 controles con diagnóstico de cefalea ó de hipertensión intracraneal benigna y no observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de KYNA en suero al compararlo con los controles⁶⁸. En Dinamarca, el estudio realizado por Olsson que incluyó 58 pacientes (44 mujeres y 14 hombres) con EMRRn ó CIS (Síndrome Clínico Aislado) encontró que había una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de KYNA siendo incrementados respecto a los controles sanos los cuales tenían edades entre 18 y 55 años⁶⁹.

En nuestro estudio se evidenció una disminución de las concentraciones de KYNA a nivel periférico respecto a los individuos sanos en los tres subgrupos de EM. Se observó una tendencia decreciente conforme era una mayor severidad de la enfermedad lo cual puede estar relacionado con una mayor inactividad física dada la discapacidad de los grupos con EMP. Lo anterior coincide con lo reportado en el caso de las mediciones realizadas por Olsson con espectroscopía de masas⁶⁹. Difiere de los otros estudios dado que en nuestro caso y el antes mencionado se midieron niveles de KYNA en suero en pacientes con EMRRn por lo que es lo más cercano a lo que ocurre en la enfermedad antes de ser influenciada por el TME. Además, nuestro estudio aporta el hecho de abarcar pacientes con forma progresiva, en quienes también se encontró una disminución significativa en comparación con los individuos sanos⁵. Cabe aclarar que la toma de muestra del grupo EMP fue antes del tratamiento y antes de ser diagnosticados con la forma progresiva de la enfermedad; sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de KYNA a nivel periférico entre el grupo EMRRn y EMP.

Los niveles periféricos de 3-HK de voluntarios sanos fueron comparados con los niveles de los pacientes con EM. Dada la estandarización de la técnica para muestras de suero en humanos en las mediciones de KYNA, no se contó con muestra para este segundo metabolito en algunos casos. Se tomaron en cuenta 12 voluntarios sanos, en el grupo EMRRn 12 pacientes, en el grupo EMP 9 pacientes y 5 EMPt. Al analizar los niveles de 3-HK de voluntarios sanos con el grupo EMRRn no se encontró diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, al comprar los niveles de 3-HK de los voluntarios sanos con el grupo de EMP y EMPt, se encontró un aumento estadísticamente significativo. Esto sugiere un desbalance en la producción de metabolitos de la VK con capacidad de atravesar barrera hematoencefálica y en consecuencia favorecer la producción de metabolitos como el ácido quinolinico el cual está involucrado con excitotoxicidad⁵³. Nuestros resultados concuerdan con el trabajo de 2017 de Guillemin, quien encontró un aumento en los niveles 3-HK a nivel periférico en el grupo con la forma progresiva de la enfermedad respecto a los controles⁶⁷.

La VK se ramifica a partir del metabolito L-KYN hacia la producción de KYNA o de 3-HK¹⁴. En este análisis de los metabolitos a nivel periférico se sugiere que la vía está dirigida a la producción de 3-HK en las fases progresivas de la enfermedad respecto a las personas sanas y también al comparar el grupo EMRRn con el conjunto de pacientes progresivos. Se ha propuesto que 3-HK es un metabolito neurotóxico por diversos mecanismos tales como generación de radicales libres que inducen estrés oxidante y apoptosis¹⁴. Los resultados

sugieren que a nivel periférico los pacientes con elevación de 3-HK podrían estar en constante daño neurotóxico que los lleve a una propensión hacia la progresión de la enfermedad. Estos resultados son coherentes con publicaciones previas que sugieren la implicación de 3-HK en la fisiopatología en la EM que llevan a la progresión lo cual podría implicar la consideración respecto al tratamiento modificador de la enfermedad (TME) del paciente con riesgo a una forma progresiva de la enfermedad. En la práctica médica históricamente ha visto avances basados en estudios iniciales similares, tal como el uso de BOC las cuales actualmente conforman un criterio diagnóstico de EM⁷⁰. Por lo anterior, en cierta literatura la concentración de 3-HK podría considerarse como un biomarcador de la progresión de la enfermedad⁷¹.

En cuanto a las mediciones en LCR, no es ético someter a un sujeto sano a una punción lumbar, por lo que el estudio se limitó a pacientes con otro diagnóstico neurológico diferente a EM para compararlos. Dado que KYNA no atraviesa la barrera hematoencefálica⁷² podemos esperar que los niveles de tal metabolito medidos en LCR son diferentes en su comportamiento a los encontrados en nivel periférico.

En este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de KYNA en LCR entre los grupos de pacientes EMRRn, EMP, EMPt al compararlos con el grupo no-EM. Dentro de los factores que pueden explicar la discrepancia con la literatura se encuentra que la justificación clínica para realizar una punción lumbar en el grupo control fue más estricta siendo extremadamente raro que a un joven con cefalea se le realice una punción lumbar o que una mielopatía compresiva se puncione antes de realizar un estudio de imagen que nos confirme ese diagnóstico. Dentro del grupo no-EM existen pacientes con diagnóstico de neurocisticercosis siendo esta una infección probablemente influya en la VK; sin embargo, no existen estudios previos entre este diagnóstico y la VK que aporten datos de referencia. Por otro lado, el grupo de edad es mayor en el grupo no-EM con un promedio de edad de 43.35 años respecto a los subgrupos de EM cuyo promedio de edad más alto es de 35.13 años en el grupo EMP.

Las primeras mediciones en LCR del metabolito KYNA fueron realizadas en 2002 en población polaca por Rejdak quien incluyó 20 pacientes en remisión con diagnóstico de EMRRn y 6 con EMP cuyos niveles de KYNA en LCR fueron comparados con niveles de 16 pacientes con enfermedades inflamatorias (meningitis virales) encontrando niveles de 0.67 pmol/ml y en 23 pacientes con enfermedades no inflamatorias del SNC, siendo 15 con

diagnóstico de polineuropatía idiopática y 5 con mielopatía espondilótica. No hubo diferencias en las concentraciones de KYNA en LCR entre EMRRn y EMP. Al comparar los niveles de KYNA en el grupo de enfermedades no inflamatorias del SNC (0.67 pmol/ml) y el grupo EMRR se encontraron niveles de KYNA en LCR significativamente disminuidos (0.41 pmol/ml) en este último grupo³³. Lo anterior coincide con el trabajo de Tomossi quien reportó niveles disminuidos de KYNA en LCR en pacientes con EMRR de dos años de seguimiento (0.5 nM) siendo estadísticamente significativa al compararlo con el grupo control con 0.9 nM cuya n fue de 9 y fueron diagnosticados con cefalea e hipertensión intracraneal benigna⁶⁸. Lo anterior contrasta con los resultados 5 años después por el mismo Radjak cuando repitió las mediciones en pacientes ahora en recaída siendo 20 pacientes con EMRR y 10 controles en dónde reportó elevación de los niveles de KYNA en LCR estadísticamente significativa³¹. Ante el panorama anterior se han realizado hipótesis acerca de la elevación de KYNA en LCR como un mecanismo neuroprotector en los pacientes con EMRR durante la actividad de la enfermedad cuyo nivel disminuye durante etapas de remisión; sin embargo, ese efecto no se ha evidenciado en las formas progresivas.

En 2016, el trabajo de Aeinehband analizó los niveles de KYNA en LCR en dos cohortes. En la primera cohorte fueron 38 pacientes con EMRRn con niveles de 2.0 nmol/L. En los grupos controles fueron 20 pacientes con niveles de 2.1 nmol/L quienes tenían otro diagnóstico neurológico con RMI normal; dentro de estos los diagnósticos fueron: vértigo, ansiedad, síndrome post conmocional, alteraciones sensitivas inespecíficas, neuroastenia y paresias relacionadas a alcohol. Un segundo grupo control incluyó a 13 pacientes con enfermedad neuroinflamatoria reportando niveles de 6.8 nmol/L; los diagnósticos de este grupo fueron los siguientes: encefalitis herpética, Lupus Eritematoso Sistémico, Leucoencefalopatía multifocal progresiva y enfermedad desmielinizante no especificada. En la segunda cohorte fueron 48 pacientes con EMRR con menos de 5 años de diagnóstico por lo que en esta segunda cohorte 39 pacientes no habían sido tratados y el resto sí había estado bajo TME. Al realizar la división en subtipos de la EM reportaron 14 en forma progresiva en los cuales encontraron niveles de KYNA de 3.6 nmol/L en los que tenían mayor tiempo del diagnóstico. En este estudio se concluyó que los niveles de KYNA en LCR se reportaron elevados en la actividad de la enfermedad y disminuidos en la remisión de la enfermedad respecto a sus grupos control; también reportaron niveles elevados de KYNA en el subgrupo de EMP respecto al grupo control más no así con el grupo de enfermedades neuroinflamatorias³⁷. En nuestro estudio entre los grupos no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas en los niveles de KYNA a nivel de SNC, lo que podría estar relacionado con el diagnóstico de los pacientes no-EM.

En nuestro estudio, las concentraciones de QUIN a nivel central al comparar entre grupos, no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa. Las hipótesis acerca de las elevaciones de QUIN en pacientes con EM se encaminan a la neurotoxicidad de este metabolito, que podría alterar la remielinización e incluso se ha llegado a proponer como un biomarcador de recaída o progresión^{25,71}. Los niveles de QUIN a nivel central tienen efectos neurotóxicos; sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de EMP y EMPt, lo cual podría sugerir un mecanismo de neurodegeneración en el cual no impacta el tratamiento administrado.

En los trabajos de Aeinehband se ha estudiado la concentración de QUIN en LCR encontrando que durante las recaídas los pacientes con EMRR elevan los niveles de QUIN en promedio en 22.7 (± 2.3) nmol/L⁷³. Mientras tanto, en los trabajos de Tomosi se ha reportado que los niveles de QUIN, al comparar pacientes con EMRR contra controles se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa⁶⁸. La medición a nivel central de este metabolito representa un desafío clínico y ético dado que la forma de obtención de muestra de LCR, punción lumbar, es un procedimiento invasivo. Por tal razón, el panorama completo sobre las concentraciones de QUIN en SNC está limitado a la primera medición diagnóstica de la enfermedad, desconociendo el comportamiento de estos metabolitos en el tiempo en los subtipos de EM.

En nuestro estudio se encontró un incremento de las citocinas proinflamatorias en el grupo progresivo siendo estadísticamente significativo para la IL-6. En estudios previos se reportó la concentración de IL-6 en 8.7 pg/ml, TNF- α 1.87 pg/ml, IL-10 0.82 pg/ml e IL-4 0.23 pg/ml en pacientes con EMRR¹⁷; sin embargo, no se ha caracterizado en pacientes con EMP en el estudio previo mencionado. En 2017 el equipo de Lim, se midieron citocinas proinflamatorias reportaron IL-2 en 17 pg/ml e IL-7 en 13 pg/ml, además de una correlación positiva entre INF- γ y la concentración de QUIN⁶⁷. Lo anterior sugiere un desequilibrio hacia las citocinas proinflamatorias y perfiles de citocinas inflamatorias por subtipo de EM. En pocas ocasiones se han reportado mediciones de citocinas en pacientes con EM que han sido tratados, por lo que es valiosa los niveles de citocinas en este subgrupo que no fue diferente estadísticamente de los otros.

En genes que codifican a proteínas de la VK se han descrito variantes genéticas que están asociadas a autismo, discapacidad intelectual, trastornos del neurodesarrollo, EM y esquizofrenia^{46,48,54,55,74,75}. En algunos casos estas variantes cuando son clasificadas como patogénicas se han asociado con condiciones monogénicas con patrón de herencia autosómico recesivo en fenotipos severos, tales como Hidroxikinurinuria (OMIM #236800). En otros casos las alteraciones genéticas indican asociación y no una relación causal entre las variantes genéticas (en su mayoría clasificadas como benignas) y las respectivas enfermedades. La primera vez que se estableció una asociación de un gen que codifica a una enzima en la VK con la EM fue en 2009 con un análisis de desequilibrio de ligamiento en regiones fuera de los HLA^{47,48}.

En nuestro estudio se identificaron variantes genéticas en dos grupos analizados independientes a los que se analizó la concentración de las enzimas de la VK. En el primer grupo son WES públicos de pacientes de origen marroquí e italiano con EM y el segundo grupo en pacientes mexicanos con fenotipo neurológico.

En pacientes con EM y pacientes mexicanos con fenotipo neurológico se encontró la variante NM_003679.5:c.809+142C>T, que se localiza en el gen que codifica a la enzima KMO y tiene una alta frecuencia en población americana. En algunos trabajos se asoció con el riesgo de Esquizofrenia⁴⁶ y depresión⁴⁸. Sin embargo, la asociación de esta variante genética con EM no ha sido estudiada.

En pacientes con EM y en pacientes mexicanos con fenotipo neurológico se encontró la variante NM_001082971.2:c.49A>G, la cual se localiza en *DDC*, que codifica para la enzima DOPA descarboxilasa. Esta enzima es crucial para la biosíntesis de los neurotransmisores dopamina y serotonina, ya que cataliza la descarboxilación de la L-DOPA a dopamina y del 5-hidroxitriptófano a serotonina. Estos neurotransmisores desempeñan papeles clave en diversos procesos neurológicos, como la regulación del estado de ánimo, la recompensa y el control motor.

En la familia A del estudio SRP199159 en los individuos II-4 y III-3 con EM se encontró la variante genética en *WARS2* que produce un cambio de glicina por ácido aspártico en la posición 40 afectando un residuo altamente conservado. La función de este gen codifica la triptofanil-ARNt sintetasa mitocondrial, responsable de la ligación del triptófano a su ARNt. La variante genética *WARS2*:p.G40D es clasificada como de significado incierto pero dadas

las características de este cambio y la baja frecuencia poblacional podría tener una tendencia hacia la patogenicidad.

En pacientes con EM se encontró la variante genética NM_001010982.5:c.451C>T que codifica la enzima arilformamidasa; sin embargo, el impacto en la función enzimática de esta variante no ha sido estudiado.

Con respecto al segundo grupo, que incluye a pacientes mexicanos con un fenotipo neurológico, identificamos dos variantes que dado su impacto en la proteína y su frecuencia alélica alta en población americana se predijo la estructura tridimensional de la proteína con la variante genética.

En primer lugar, identificamos en pacientes mexicanos con fenotipo neurológico la variante NM_003937.3:c.1234A>G localizada en *KYNU* da lugar a la sustitución de K412E. Aunque esta variante no ha sido asociada con fenotipos neurológico ni EM en pacientes mexicanos, se ha reportado que este cambio de aminoácido no sinónimo tiene una asociación significativa con la hipertensión esencial en la población China Han. Las distribuciones de alelos y genotipos de esta variante mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes hipertensos y los controles normotensos. En particular, la asociación en el análisis de subgrupos de hombres sugiere una posible susceptibilidad genética específica de cada sexo a la hipertensión mediada por esta variante⁷⁶. En la predicción de la proteína se encontró un cambio en la interacción entre los aminoácidos en la posición 412 y 461 al comparar la proteína WT con la predicción de la consecuencia en la proteína de esta variante genética; sin embargo, el efecto en la actividad enzimática de este cambio no ha sido estudiado. Dado que la posición 412 afecta una región cercana a la arginina en la posición 434 la cual ayuda en la estabilización del piridoxal-5-fosfato podría modificar la afinidad por este cofactor y con ello la actividad catalítica⁷⁷.

En segundo lugar, en pacientes mexicanos con fenotipo neurológico se encontró la variante NM_194294.2:c.742C>T localizada en *IDO2*, que codifica para la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa 2. La variante da lugar a la sustitución R248W en la proteína IDO2, la cual se ha relacionado con una reducción de la actividad catalítica de la IDO2⁵⁶. En una cohorte italiana no se observaron diferencias significativas en la distribución de la variante R248W entre los pacientes con EM y los controles sanos, ni se asoció con la edad de inicio o la progresión de la enfermedad en la EM⁷⁵. Mientras que en un estudio de la población China

Figura 15. Resumen de discusión. En el escenario de pacientes se muestra el comportamiento de metabolitos a nivel periférico donde la elevación de 3-HK a nivel periférico genera una mayor concentración de sustrato a nivel central y como consecuencia mayor elevación de QUIN ante un ambiente proinflamatorio predominante en IL-6 y TNF-alfa. Lo anterior produce daño como daño mitocondrial directo, peroxidación lipídica y excitotoxicidad.

En este estudio piloto hemos obtenido resultados coherentes con la literatura evidenciando que en la población mexicana con EM también podría estar involucrada la VK. Dentro de las fortalezas de nuestro estudio se encuentra la medición a nivel de SNC de metabolitos clave de la VK. Además, se analizaron muestras de pacientes con EM naïve así como de pacientes con la forma progresiva de la enfermedad y tratados, lo cual nos da una perspectiva sobre el impacto de los tratamientos actuales en el metabolismo de la VK.

Dentro de las limitaciones de nuestro trabajo se encuentra, que en este estudio de caracterización, no contamos un número de muestras que nos permitan tener suficiente poder estadístico poblacional. Tampoco se obtuvieron muestras de controles con diagnósticos similares a los de la literatura científica, cuyos criterios son más laxos para realizar una punción lumbar, lo cual pudo haber influido en el análisis estadístico.

9 Perspectivas

Un factor que recientemente ha tomado relevancia en el estudio de la VK en esta enfermedad es el sobrepeso y obesidad que de acuerdo con trabajos de Zimmer ha descrito que la actividad de la VK se encuentra incrementada de manera sistémica en pacientes con sobrepeso y obesidad llevando a una acumulación de los metabolitos; sin embargo, esto no correlacionó con progresión o aumento en la escala de discapacidad⁷³. Esta variable que nosotros no tomamos en cuenta dada la falta de información en las notas médicas. Otro factor que valorar en posibles estudios futuros sería la variable de actividad física la cual activa la VK de manera periférica hacia la rama de producción de KYNA generando un posible beneficio en la rehabilitación de estos pacientes tal como se cometa en el ensayo clínico NCT03652519 realizado también por Zimmer y publicado en Neurology en 2021⁷⁹. Por lo anterior, se requieren más estudios para esclarecer si en la población mexicana con EM podría estar involucrada la VK.

Como se sospechaba por estudios de ancestría³, el comportamiento de la EM en pacientes mexicanos podría estar influenciada por el componente genético que predisponga a formas progresivas de la enfermedad.

10 Conclusiones

Las concentraciones de los metabolitos de la VK en pacientes mexicanos con EM son diferentes a individuos sanos en la periferia.

11 Referencias

1. Ward, M. & Goldman, M. D. *Epidemiology and Pathophysiology of Multiple Sclerosis*. <http://journals.lww.com/continuum> (2022).
2. Carlos, C. *et al.* *Consenso Mexicano Para La Esclerosis Múltiple. Guía Diagnóstica y Terapéutica Mexican Consensus for Multiple Sclerosis. Diagnostic and Therapeutic Guide*. *Rev Mex Neuroci* vol. 8 (2007).
3. Aguirre-Cruz, L., Flores-Rivera, J., De La Cruz-Aguilera, D. L., Rangel-Lpez, E. & Corona, T. Multiple sclerosis in Caucasians and Latino Americans. *Autoimmunity* **44**, 571–575 (2011).
4. Wallin, M. T. *et al.* Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* **18**, 269–285 (2019).
5. Thompson, A. J. *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* vol. 17 162–173 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2) (2018).
6. Correale, J., Gaitán, M. I., Ysraelit, M. C. & Fiol, M. P. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain* vol. 140 527–546 Preprint at <https://doi.org/10.1093/brain/aww258> (2017).
7. Nourbakhsh, B. & Mowry, E. M. *Multiple Sclerosis Risk Factors and Pathogenesis*. <http://journals.lww.com/continuum> (2019).
8. Zimmermann, H. G. *et al.* Association of retinal ganglion cell layer thickness with future disease activity in patients with clinically isolated syndrome. *JAMA Neurol* **75**, 1071–1079 (2018).
9. Benkert, P. *et al.* *Serum Neurofilament Light Chain for Individual Prognostication of Disease Activity in People with Multiple Sclerosis: A Retrospective Modelling and Validation Study*. www.thelancet.com/neurology (2022).
10. Trapp, B. D. & Nave, K. A. Multiple sclerosis: An immune or neurodegenerative disorder? *Annual Review of Neuroscience* vol. 31 247–269 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313> (2008).
11. Frischer, J. M. *et al.* The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* **132**, 1175–1189 (2009).
12. Lassmann, H. What drives disease in multiple sclerosis: Inflammation or neurodegeneration? *Clinical and Experimental Neuroimmunology* vol. 1 2–11 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1759-1961.2009.00003.x> (2010).

13. Clark, D. N. *et al.* Prolonged STAT1 activation in neurons drives a pathological transcriptional response. *J Neuroimmunol* **382**, (2023).
14. Juricek, L. *et al.* AhR-deficiency as a cause of demyelinating disease and inflammation. *Sci Rep* **7**, (2017).
15. Juricek, L. & Coumoul, X. The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
16. Andreadou, M. *et al.* IL-12 sensing in neurons induces neuroprotective CNS tissue adaptation and attenuates neuroinflammation in mice. *Nat Neurosci* **26**, 1701–1712 (2023).
17. Gębka-Kępińska, B. *et al.* Cytokine Profiling in Cerebrospinal Fluid of Patients with Newly Diagnosed Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (RRMS): Associations between Inflammatory Biomarkers and Disease Activity. *Int J Mol Sci* **25**, 7399 (2024).
18. Pitt, D., Werner, P. & Raine, C. S. *Glutamate Excitotoxicity in a Model of Multiple Sclerosis*. *NATURE MEDICINE • VOLUME* vol. 6 <http://medicine.nature.com> (2000).
19. Yan, J., Peter Bengtson, C., Buchthal, B., Hagenston, A. M. & Bading, H. Coupling of NMDA receptors and TRPM4 guides discovery of unconventional neuroprotectants. *Science* (1979) **370**, (2020).
20. Jafari, M. *et al.* Phagocyte-mediated synapse removal in cortical neuroinflammation is promoted by local calcium accumulation. *Nat Neurosci* **24**, 355–367 (2021).
21. Srinivasan, R., Sailasuta, N., Hurd, R., Nelson, S. & Pelletier, D. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain* **128**, 1016–1025 (2005).
22. González Esquivel, D. *et al.* Kynurenine pathway metabolites and enzymes involved in redox reactions. *Neuropharmacology* vol. 112 331–345 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.013> (2017).
23. Bosco, M. C. *et al.* The Tryptophan Catabolite Picolinic Acid Selectively Induces the Chemokines Macrophage Inflammatory Protein-1 α and -1 β in Macrophages. *The Journal of Immunology* **164**, 3283–3291 (2000).
24. Melillo G, C. G. R. D. V. Melillo G, Cox GW, Radzioch D, Varesio L. Picolinic acid, a catabolite of L-tryptophan, is a costimulus for the induction of reactive nitrogen intermediate production in murine macrophages. *J Immunol*. 1993. (1993).
25. Flanagan, E. M., Erickson, J. B., Viveros, O. H., Chang, S. Y. & Reinhard, J. F. Neurotoxin Quinolinic Acid Is Selectively Elevated in Spinal Cords of Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis. *J Neurochem* **64**, 1192–1196 (1995).

26. Chiarugi, A., Cozzi, A., Ballerini, C., Massacesi, L. & Moroni, F. *Kynurenine 3-Mono-Oxygenase Activity and Neurotoxic Kynurenine Metabolites Increase in the Spinal Cord of Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis*. www.elsevier.com/locate/neuroscience (2001).
27. Sundaram, G. *et al.* Quinolinic acid toxicity on oligodendroglial cells: Relevance for multiple sclerosis and therapeutic strategies. *J Neuroinflammation* **11**, (2014).
28. Guillemin, G. J. *et al.* *IFN- β 1b Induces Kynurenine Pathway Metabolism in Human Macrophages: Potential Implications for Multiple Sclerosis Treatment* SHORT COMMUNICATION. *JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH* vol. 21 (2001).
29. Sakurai, K., Zou, J.-P., Tschetter, J. R., Ward, J. M. & Shearer, G. M. *Effect of Indoleamine 2,3-Dioxygenase on Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. <http://rsb>. (2002).
30. Monaco, F., Fumero, S., Mondino, A. & Mutani, R. *Plasma and Cerebrospinal Fluid Tryptophan in Multiple Sclerosis and Degenerative Diseases*. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* vol. 42 (1979).
31. Rejdak, K. *et al.* *Decreased Level of Kynurenic Acid in Cerebrospinal Fluid of Relapsing-Onset Multiple Sclerosis Patients*. www.elsevier.com/locate/neulet (2002).
32. Németh, H., Toldi, J. & Vécsei, L. *Role of Kynurenines in the Central and Peripheral Nervous Systems*. *Current Neurovascular Research* vol. 2 (2005).
33. Rejdak, K. *et al.* Astrocytic activation in relation to inflammatory markers during clinical exacerbation of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neural Transm* **114**, 1011–1015 (2007).
34. Amirkhani, A. *et al.* *Interferon- β Affects the Tryptophan Metabolism in Multiple Sclerosis Patients*. (2005).
35. Hartai, Z. *et al.* Kynurenine metabolism in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* **112**, 93–96 (2005).
36. Lovelace, M. D. *et al.* Current evidence for a role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00246> (2016).
37. Aeinehband, S. *et al.* Cerebrospinal fluid kynurenines in multiple sclerosis; relation to disease course and neurocognitive symptoms. *Brain Behav Immun* **51**, 47–55 (2016).
38. Nourbakhsh, B. *et al.* Altered tryptophan metabolism is associated with pediatric multiple sclerosis risk and course. *Ann Clin Transl Neurol* **5**, 1211–1221 (2018).

39. Bansi, J. *et al.* Persons with secondary progressive and relapsing remitting multiple sclerosis reveal different responses of tryptophan metabolism to acute endurance exercise and training. *J Neuroimmunol* **314**, 101–105 (2018).
40. Fathi, M. *et al.* Dynamic changes in kynurenine pathway metabolites in multiple sclerosis: A systematic review. *Frontiers in Immunology* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1013784> (2022).
41. di Nuzzo, L., Orlando, R., Nasca, C. & Nicoletti, F. Molecular pharmacodynamics of new oral drugs used in the treatment of multiple sclerosis. *Drug Des Devel Ther* **8**, 555–567 (2014).
42. Bohár, Z., Toldi, J., Fülöp, F. & Vécsei, L. Changing the face of kynurenines and neurotoxicity: Therapeutic considerations. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 16 9772–9793 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms16059772> (2015).
43. Beadle, G. W., Mitchell, H. K. & Nyc, J. F. *Kynurenine as an Intermediate in the Formation of Nicotinic Acid from Tryptophane by Neurospora*. <https://www.pnas.org> (1947).
44. Nematollahi, A., Sun, G., Jayawickrama, G. S. & Church, W. B. Kynurenine aminotransferase isozyme inhibitors: A review. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms17060946> (2016).
45. Pérez-De, V., Cruz, L., Königsberg, M. & Santamaría, A. *Kynurenine Pathway and Disease: An Overview*. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets* vol. 6 (2007).
46. Aoyama, N. *et al.* Association study between kynurenine 3-monooxygenase gene and schizophrenia in the Japanese population. *Genes Brain Behav* **5**, 364–368 (2006).
47. McCauley, J. L. *et al.* Follow-up examination of linkage and association to chromosome 1q43 in multiple sclerosis. *Genes Immun* **10**, 624–630 (2009).
48. Boros, F. A., Bohár, Z. & Vécsei, L. Genetic alterations affecting the genes encoding the enzymes of the kynurenine pathway and their association with human diseases. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* vol. 776 32–45 (2018).
49. Scalfari, A. *et al.* The natural history of multiple sclerosis, a geographically based study 10: Relapses and long-term disability. *Brain* **133**, 1914–1929 (2010).
50. Ventura, R. E., Antezana, A. O., Bacon, T. & Kister, I. Hispanic Americans and African Americans with multiple sclerosis have more severe disease course than Caucasian Americans. *Multiple Sclerosis* **23**, 1554–1557 (2017).
51. JoVE. Analytical Chemistry. High-Performance Liquid Chromatography. *JoVE Science Education Database*. (2021).

52. QA. QA ELISA Kit (OKCD02284) Lot# BJ09132021 Instructions for Use. www.avivasysbio.com-888.880.0001.
53. Becton, D. *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit Instruction Manual*. (2009).
54. Tărlungeanu, D. C. *et al.* Impaired Amino Acid Transport at the Blood Brain Barrier Is a Cause of Autism Spectrum Disorder. *Cell* **167**, 1481-1494.e18 (2016).
55. Musante, L. *et al.* Mutations of the aminoacyl-tRNA-synthetases SARS and WARS2 are implicated in the etiology of autosomal recessive intellectual disability. *Hum Mutat* **38**, 621–636 (2017).
56. Køllgaard, T. *et al.* Association of a functional Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 genotype with specific immune responses. *Oncoimmunology* **1**, 441–447 (2012).
57. Cao, T. *et al.* Single-nucleotide polymorphisms and activities of indoleamine 2,3-dioxygenase isoforms, IDO1 and IDO2, in tuberculosis patients. *Hereditas* **159**, (2022).
58. Szot, J. O. *et al.* New cases that expand the genotypic and phenotypic spectrum of Congenital NAD Deficiency Disorder. *Hum Mutat* **42**, 862–876 (2021).
59. Schüle, I. *et al.* A homozygous deletion of exon 5 of KYNU resulting from a maternal chromosome 2 isodisomy (UPD2) causes Catel-Manzke-syndrome/VCRL syndrome. *Genes (Basel)* **12**, (2021).
60. Shi, H. *et al.* NAD Deficiency, Congenital Malformations, and Niacin Supplementation. *New England Journal of Medicine* **377**, 544–552 (2017).
61. Cheminal, R., Echenne, B., Bellet, H. & Duran, M. *Congenital Non-Progressive Encephalopathy and Deafness with Intermittent Episodes of Coma and Hyperkynureninuria*. *J. Inher Metab. Dis* vol. 19 (1996).
62. Tada, K., Yokoyama, Y., Nakagawa, H., Yoshida, T. & Arakawa, T. *Vitamin B6 Dependent Xanthurenic Aciduria*. *Tohoku J. exp. Med* vol. 93 (1967).
63. Christensen, M., Duno, M., Lund, A. M., Skovby, F. & Christensen, E. Xanthurenic aciduria due to a mutation in KYNU encoding kynureninase. *J Inherit Metab Dis* **30**, 248–255 (2007).
64. Komrower, G. M. & Westall, R. *Hydroxykynureninuria*. <http://archpedi.jamanetwork.com/>.
65. Komrower, G. M., Wilson, V., Clamp, J. R. & Westall, R. G. *HYDROXYKYNURENINURIA A CASE OF ABNORMAL TRYPTOPHAN METABOLISM PROBABLY DUE TO A DEFICIENCY OF KYNURENINASE*. *Arch. Dis. Childh* (1964).

66. Braak, H. & Braak, E. *Frequency of Stages of Alzheimer-Related Lesions in Different Age Categories*. (1997).
67. Lim, C. K. *et al.* Kynurenine pathway metabolomics predicts and provides mechanistic insight into multiple sclerosis progression. *Sci Rep* **7**, (2017).
68. Tömösi, F. *et al.* A validated UHPLC-MS method for tryptophan metabolites: Application in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Pharm Biomed Anal* **185**, (2020).
69. Olsson, A. *et al.* Serum Short-Chain Fatty Acids and Associations With Inflammation in Newly Diagnosed Patients With Multiple Sclerosis and Healthy Controls. *Front Immunol* **12**, (2021).
70. Tibblin, G., Link, H. & Öhman, S. Principles of albumin and igg analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest* **37**, 385–390 (1977).
71. Carrillo-Mora, P. *et al.* Kynurenines and Inflammation: A Remarkable Axis for Multiple Sclerosis Treatment. *Pharmaceuticals* **17**, 983 (2024).
72. Schwarcz, R., Bruno, J. P., Muchowski, P. J. & Wu, H. Q. Kynurenines in the mammalian brain: When physiology meets pathology. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 13 465–477 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrn3257> (2012).
73. Kupjetz, M. *et al.* The serum kynurenine pathway metabolic profile is associated with overweight and obesity in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* **72**, (2023).
74. McCauley, J. L. *et al.* Follow-up examination of linkage and association to chromosome 1q43 in multiple sclerosis. *Genes Immun* **10**, 624–630 (2009).
75. Agliardi, C. *et al.* Indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO)2 polymorphisms are not associated with multiple sclerosis in Italians. *J Neurol Sci* **377**, 31–34 (2017).
76. Zhang Y *et al.* *A Polymorphism of Kynureninase Gene in a Hypertensive Candidate Chromosomal Region Is Associated with Essential Hypertension*. (2005).
77. Lima, S., Kumar, S., Gawandi, V., Momany, C. & Phillips, R. S. Crystal structure of the Homo sapiens kynureninase-3-hydroxyhippuric acid inhibitor complex: Insights into the molecular basis of kynureninase substrate specificity. *J Med Chem* **52**, 389–396 (2009).
78. Sugimoto, H. *et al.* *Crystal Structure of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Catalytic Mechanism of O₂ Incorporation by a Heme-Containing Dioxygenase*. *PNAS* vol. 103 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508996103 (2006).
79. Joisten, N. *et al.* Exercise Diminishes Plasma Neurofilament Light Chain and Reroutes the Kynurenine Pathway in Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* **8**, (2021).

Anexo

Variantes genéticas en genes del metabolismo del triptófano en pacientes con EM					
Gen	Transcrito	Aminoácido	Nucleótido	gnomAD	Clinvar
<i>AFMID</i>	NM_001010982.5	NA	c.259+20G>T	0.06510943	VB
<i>GOT2</i>	NM_002080.4	p.Val76=	c.228T>G	0.70450658	VB
<i>KMO</i>	NM_003679.5	NA	c.809+142C>T	0.27985138	VB
<i>HAAO</i>	NM_012205.3	NA	c.81-10C>T	0.79595017	VB
<i>ACMSD</i>	NM_138326.3	NA	c.677-112C>T	0.59792805	VB
<i>DDC</i>	NM_001082971.2	NA	c.876+84G>A	0.77113092	VB
<i>AFMID</i>	NM_001010982.5	NA	c.154+19C>T	0.199846	VB
<i>TPH1</i>	NM_004179.3	NA	c.804-7C>A	0.33868402	VB
<i>AFMID</i>	NM_001010982.5	NA	c.260-30T>C	0.69148463	VB
<i>IDO1</i>	NM_002164.6	NA	c.423-90C>T	0.28114602	VB
<i>TPH1</i>	NM_004179.3	NA	c.-26-1642T>A	0.65104133	VB
<i>IDO1</i>	NM_002164.6	NA	c.857-28G>A	0.37822437	VB
<i>DDC</i>	NM_001082971.2	NA	c.945-23T>G	0.54913974	VB
<i>WARS</i>	NM_004184.4	NA	c.99+3142G>C	0.75159174	VB
<i>KYAT1</i>	NM_004059.5	NA	c.439-19A>G	0.63944292	VB
<i>TPH2</i>	NM_173353.4	p.Ala375=	c.1125A>T	0.54811603	VB
<i>WARS</i>	NM_004184.4	NA	c.99+3033A>G	0.68440968	VB
<i>WARS</i>	NM_004184.4	NA	c.99+3172G>A	0.25328246	VB
<i>ARNT</i>	NM_001668.4	p.Val189=	c.567G>C	0.41805837	VB
<i>KYAT3</i>	NM_001008661.3	p.Ser245=	c.735C>T	0.42121717	VB
<i>DDC</i>	NM_001082971.2	p.Met17Val	c.49A>G	0.99440032	VB
<i>TPH2</i>	NM_173353.4	p.Pro312=	c.936A>G	0.57777047	VB
<i>GOT2</i>	NM_002080.4	p.Val346Gly	c.1037T>G	0.74241829	VB
<i>AADAT</i>	NM_016228.4	NA	c.963-7T>C	0.6095497	VB
<i>SLC3A2</i>	NM_001013251.3	NA	c.760-41A>G	0.80282337	VB
<i>AFMID</i>	NM_001010982.5	p.Arg151Trp	c.451C>T	0.06385354	VB

Abreviaturas: VB Variante Benigna de acuerdo con la clasificación clínica de la ACMG.