



Estudi de l'estat de seleni en sang i en líquid cefaloraquídi de pacients pediàtrics amb malalties neurològiques

Mireia Tondo i Colomer

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**ESTUDI DE L'ESTAT DE SELENI EN SANG I EN LÍQUID
CEFALORAQUIDI DE PACIENTS PEDIÀTRICS AMB MALALTIES
NEUROLÒGIQUES**

Mireia Tondo i Colomer



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Farmàcia

Universitat de Barcelona

**ESTUDI DE L'ESTAT DE SELENI EN SANG I EN LÍQUID CEFALORAQUIDI DE
PACIENTS PEDIÀTRICS AMB MALALTIES NEUROLÒGIQUES**

Memòria presentada per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Mireia Tondo i Colomer

Tesi Doctoral

Barcelona, novembre 2011

Programa de Doctorat en Biomedicina

**ESTUDI DE L'ESTAT DE SELENI EN SANG I EN LÍQUID CEFALORAQUIDI DE PACIENTS
PEDIÀTRICS AMB MALALTIES NEUROLÒGIQUES**

Treball realitzat a l'Hospital Sant Joan de Déu

Esplugues de Llobregat, Barcelona

La doctoranda,

Mireia Tondo i Colomer

Vist i plau dels directors,

Dr. Rafael Artuch Iriberry

Dra. Aida Ormazabal Herrero

Barcelona, novembre 2011

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Universitat de Barcelona



Treball realitzat a l'Hospital Sant Joan de Déu

Esplugues de Llobregat, Barcelona

AGRAÏMENTS

He estat esperant fins a última hora, però ara, quan finalment ha arribat el moment d'escriure els agraïments, no m'ho puc ni creure. Al llarg d'aquests anys, m'adono que són moltes les persones que han fet que el meu dia a dia fos, per sobre de tot, una cosa que m'omple i em fa feliç. Aquesta tesi és, d'una manera o altra, de totes elles, de tots vosaltres.

A tots els pacients i els seus familiars.

A tots els membres de l'equip de malalties neurometabòliques.

A totes les persones que formen part del laboratori de l'Hospital Sant Joan de Déu, en especial a les secretàries de tarda, l'Anna Mari i la Vero. Gràcies per fer de les tardes de guàrdia tardes divertides i per tenir un bombó sempre apunt.

Als meus directors de tesi, Aida i Rafa, sou grans professionals i encara més grans persones. Em sento privilegiada de treballar al vostre costat. Un gràcies sincer al Rafa, per confiar en mi i per deixar-me seguir essent part del seu equip. L'actitud que poses al dibuixar una via metabòlica en qualsevol tros de paper em fa pensar que tenim molta sort de tenir-te com a cap. Gràcies per ensenyar-me tantes coses i per fer que cada dia m'agradi més la meva feina.

A tots els meus companys del departament de metabolopaties, la Rosa, la Montse, l'Aroa, la Merche, la Cristina, la Raquel, la Mercedes i la Laura. Amb la vostra presència i la vostra actitud heu fet que aquests anys de feina hagin estat un plaer. Tres mencions especials dins del grup:

- M^aAntònia: t'has convertit en un gran referent per a mi, la teva professionalitat i l'estima que poses en tot el que fas és d'envejar. Gràcies per tot.

- Joan: no tinc paraules per agrair-te el suport tècnic constant amb l'ICP-MS, no recordo ni un sol dia en el que no hagi estat disposat a ajudar-me a l'instant. A més a més, agrair-te també l'actitud, sempre amb ganes de riure i disposat a dir-nos qualsevol paraula bonica per alegrar-nos el dia. Aquest grup no seria el mateix sense tu.

- Marta: mai trobaré les paraules adequades per dir-te tot el que has aportat a la meva residència i a la meva vida. Més enllà de ser una meravellosa companya de feina, t'has convertit en una molt bona amiga. Ets el millor record de la meva residència. Eternament gràcies. Et mereixeries una pàgina sencera d'agraïments.

A totes les persones que formen part del departament de genètica molecular, en Jordi, la Montse, la Judit, la Núria i l'Edgar. Dedicació especial a la Loreto, per creure en mi, per deixar-me la porta sempre oberta i per cedir-me la seva taula. Menció a part pel Dani, gràcies per les coreografies i per les rialles infinites.

A les tres estrelles que formen el departament de gastroenterologia. A vosaltres, Teresa, Maribel i Carme. Gràcies per acollir-me sempre tan i tan bé, en cap altre departament del laboratori em sento tan a casa com en el vostre. Sempre esteu disposades a escoltar, a fer-me riure o a donar-me un bon consell. Sou més que companyes de feina i la vostra presència ha estat clau per fer d'aquests anys al laboratori una època meravellosa.

Un GRÀCIES amb majúscules per tu, Carme. Per tot. Ets ja part de mi. Gràcies per tenir totes les facetes, la de companya, la de *jefa*, la de mare i la d'amiga. No cal afegir res més.

A les meves amigues, les de sempre, les de Vic : a la Furri, l'Eli i la Clara S. Tot el que hem passat juntes és impagable. Malgrat la separació física, hi sou, hi heu estat i hi sereu sempre. La meva vida no s'entén sense vosaltres.

A La meva gran amiga Carol, ja saps que nosaltres havíem de ser amigues, o això deien les nostres mares. I al final, la vida ens va tornar a unir. No sé què faria sense tu, sóc afortunada de tenir-te al costat. Gràcies per haver compartit cada moment amb mi.

A les meves meravelloses amigues d'Erasmus. Gràcies Alba, Ana i Marta. Todo lo vivido a vuestro lado ocupa el podio de mis mejores recuerdos. Gràcies per tots els viatges, les escapades de cap de setmana, els sopars, les festes i les converses. Anita, eres simplemente genial. Alba, a tu no t'haig de dir res que no sàpigues ja, em fa molta il·lusió saber que d'aquí res ens trobarem als Estats Units.

A totes les altres persones que al llarg d'aquests anys han fet que m'encanti la meva vida a Barcelona. Gràcies pels concerts entre setmana, pels sopars que s'allarguen i per les tardes d'estiu a la platja o en una terrassa qualsevol. A vosaltres Jordi, Bea, Julieta i David.

Als meus germans, Guillem i Carles.

Als meus pares, Joan i Mercè. Mai us podré agrair tot el que heu fet per mi. Gràcies per donar-m'ho tot, créixer com a persona al vostre costat és i ha estat un privilegi. Sóc qui sóc gràcies a vosaltres. Gràcies per estimar-nos tant, però sobretot, gràcies per estimar-vos i respectar-vos tant. Si aquesta tesi és d'alguna persona, és vostra. De tot cor.

Never stop the music

**A l'Àvia,
per ensenyar-me que el millor remei és l'alegria.**

**A la Mare,
perquè sé que a tu també t'hauria agradat escriure una tesi. Podem compartir aquesta.**

ÍNDEX

ABREVIATURES	17
INTRODUCCIÓ	19
<u>1- Fisiologia del seleni</u>	21
<u>2- Els errors congènits del metabolisme com a model de malaltia amb deficiència de seleni</u>	25
<u>3- Estat de seleni en el sistema nerviós central avaluat pel líquid cefaloraquidi</u>	26
<u>4- Avaluació de l'estat de seleni en líquid cefaloraquidi en pacients amb trastorns neurològics</u>	30
<u>5- Paper del seleni en el sistema nerviós central: funció antioxidant i regulació de la síntesi de dopamina</u>	31
<u>6- Tècniques per a la determinació de seleni en matrius biològiques</u>	32
JUSTIFICACIÓ DE LA UNITAT TEMÀTICA I HIPÒTESI	35
<u>1- Justificació de la unitat temàtica</u>	37
<u>2- Hipòtesi</u>	37
OBJECTIU	39
<u>1- Objectiu principal</u>	41
<u>2- Objectius concrets</u>	41
PACIENTS, MATERIAL I MÈTODES	43
<u>1-Pacients</u>	45
Població d'estudi per a la determinació de seleni en sang: valors normals i de pacients amb errors congènits del metabolisme	45
Població d'estudi per a la determinació de seleni en líquid cefaloraquidi: valors normals i de pacients amb errors congènits del metabolisme	46
Població de pacients amb la síndrome de Kearns-Sayre	48
Aspectes ètics	48
<u>2- Mètodes analítics</u>	48
Extracció de la mostra: sang i líquid cefaloraquidi (LCR). Criteris d'exclusió	49

Anàlisi automatitzats en LCR: proteïnes i albúmina	50
Anàlisi de seleni en sang i en LCR	50
Anàlisi d'amines biògenes en LCR	52
Determinació de l'activitat GPx en LCR	54
Determinació de la concentració de 5- metiltetrahidrofolat en LCR	55
<u>3- Mètodes estadístics</u>	57
Validació dels procediments analítics	57
Anàlisi estadístic	58
RESULTATS	61
<u>1- Estandardització i validació de procediments analítics per a la determinació de seleni i altres elements en sang i establiment de valors de referència propis en una població pediàtrica. Estudi de l'estat del seleni en sang en pacients amb errors congènits del metabolisme amb tractament dietètic i sens tractament</u>	61
<u>2- Estandardització i validació de procediments analítics per a la determinació de seleni en LCR i establiment de valors de referència en una població pediàtrica</u>	73
<u>3- Determinació de la concentració de seleni en LCR així com la seva relació amb altres marcadors bioquímics en LCR en pacients amb trastorns neuropediàtrics amb diagnòstic etiològic</u>	81
<u>4- Estudi de les implicacions de l'excés de seleni en la síndrome de Kearns-Sayre</u>	101
DISCUSSIÓ	109
<u>1. Discussió conjunta</u>	111
<u>2. Discussió per temes</u>	112
CONCLUSIONS	123
BIBLIOGRAFIA	127
ANNEX	139
<u>1- Altres publicacions de la doctoranda</u>	141
<u>2- Nous estudis derivats</u>	141

ABREVIATURES

BHE	Barrera hematoencefàlica
CV	Coefficient de variació
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DS	Desviació estàndard
ECM	Errorls congènits del metabolisme
GPx	Glutatió peroxidasa
5-HIAA	5-hidroxiindolacètic
HPLC	Cromatografia líquida d'alta pressió
HVA	Àcid homovanílic
ICP-MS	Espectrometria de masses amb font de plasma acoblada
KSS	Síndrome de Kearns-Sayre
LCR	Líquid cefaloraquídi
5-MTHF	5-metiltetrahidrofolat
OAT-3	Transportador cerebral d'àcids orgànics
PKU	Fenilcetonúria
Sec	Selenocisteïna
SeP	SelenoproteïnaP
SNC	Sistema nerviós central
ROS	Espècies oxigen-reactives
tRNA	Àcid ribonucleic de transferència

INTRODUCCIÓ

1- Fisiologia del seleni

- Absorció, biodisponibilitat i deficiències nutricionals*
- Transport de Se a través de la BHE i funcions biològiques de les selenoproteïnes*

2- Els ECM com a model de malaltia amb deficiència de seleni

- Antecedents (dèficits ja demostrats de Se en ECM)*
- Efecte potencial del dèficit de Se en les funcions neurològiques (defectes de Se relacionats amb alteracions neurològiques en la PKU)*

3- Estat de Se en el sistema nerviós central avaluat pel LCR

4- Avaluació de l'estat de Se en LCR en pacients amb trastorns neurològics

5- Paper del Se en el SNC: funció antioxidant i regulació de la síntesi de dopamina

6- Tècniques per a la determinació de Se en matrius biològiques

1- Fisiologia del seleni

- Absorció, biodisponibilitat, deficiències nutricionals

- Transport de Se a través de la BHE i funcions biològiques de les selenoproteïnes

El Seleni (Se) va ser descobert l'any 1817 per un químic suec anomenat Berzelius quan buscava l'origen d'una malaltia que patien els treballadors d'una fàbrica d'àcid sulfúric a Suècia. Durant anys se'l va considerar potencialment tòxic i no va ser fins l'any 1957 que Schwarz i els seus estudis van demostrar el seu paper beneficiós i essencial per a l'ésser humà (Wilber, 1980). Actualment el paper biològic del Se en els éssers vius està ben establert i s'accepta el Se com un element traça essencial, amb una àmplia distribució en tot l'organisme i amb una homeòstasi ben regulada, especialment a nivell del cervell (Burck, 2003).

Existeixen diferents tipus de Se, l'inorgànic (en forma de selenit i selenat) i l'orgànic (en forma de selenocisteïna i selenometionina). El nostre organisme incorpora tots dos tipus de Se de fonts nutricionals diverses, principalment de llegums, cereals i carn. Una cascada complexa de reaccions converteix els compostos de Se inorgànic cap a formes orgàniques i viceversa. El Se és el precursor de la selenocisteïna (Sec) a la que es coneix com el 21è aminoàcid. Un cop formada la Sec, la seva incorporació a les selenoproteïnes passa de manera única i particular: el codó de la Sec és un trinucleòtid UGA, que és normalment un codó de terminació. El reconeixement del UGA com a codó per a l'entrada de Sec requereix la presència d'unes seqüències reguladores conegudes amb el nom de SECIS (Sec insertion sequence) situades en la

regió 3' no transcrita (UTR). Una característica comú de les selenoproteïnes és que totes inclouen un o més residus de Sec en la seva estructura primària.

Amb excepció de la Selenoproteïna P (SeP), totes les altres selenoproteïnes tenen activitat enzimàtica i és en el centre catalític de l'enzim on tenen l'aminoàcid Sec. De forma general, l'heterogeneïtat funcional de les selenoproteïnes és un fet constant ja que la seqüència d'aminoàcids, l'activitat enzimàtica i l'expressió en els diferents teixits és extremadament variable. El paper i la funció d'algunes d'aquestes selenoproteïnes resta encara per descobrir, de tota manera, les funcions que se'ls hi atribueixen són nombroses i abracen aspectes tan diversos com prevenció del càncer, fertilitat masculina, metabolisme de les hormones tiroïdals, funcions immunes, funcions del SNC i funcions musculars, entre d'altres (Moghadaszadeh, 2006). Degut a les nombroses funcions de les selenoproteïnes, s'entén que la deficiència de Se disminueixi la seva activitat biològica, fet que pot conduir al desenvolupament de certs estats patològics (Brenneise, 2005).

Una selenoproteïna clau pel metabolisme del Se és la SeP, ja que a part de ser la selenoproteïna majoritària del plasma incorpora fins a 10 residus de Sec. És una proteïna de síntesis hepàtica i conté el 50% del contingut total de Se del plasma humà. Les seves funcions són dues, essent la principal la d'emmagatzematge i transport de Se. L'altra funció és possible gràcies a les propietats redox del Se, que també confereixen a la proteïna activitat antioxidant. Des d'un punt de vista metabòlic, el Se provinent de la dieta és lliurat al fetge on s'utilitza per a la síntesis de SeP. La SeP és després alliberada al plasma i lliurada als teixits diana on és transportada a nivell intracel·lular mitjançant receptors específics. Dins la cèl·lula, la SeP allibera la Sec i

aquesta es degrada per alliberar el Se que alhora serà reciclat per a la síntesis *de novo* d'altres selenoproteïnes.

Especialment conegut és l'enzim glutatió peroxidasa (GPx) i més concretament el GPx1, ja que és un dels principals enzims antioxidants de l'organisme amb una distribució ubiqua i amb un paper clau en la desintoxicació dels radicals lliures derivats de l'oxigen (Brenneise, 2005). En la **figura 1** es representen de forma gràfica les reaccions de desintoxicació en les quals està implicat el GPx. Nombrosos treballs demostren que la deficiència dels nivells fisiològics de Se està associada a un augment de l'estrès oxidatiu (Brenneise, 2005; Pyne-Geithman, 2009; Velázquez, 2009). Alguns ECM cursen amb un defecte de Se però en aquest cas secundari ja que el motiu són les restriccions nutricionals. Les conseqüències però, també s'acaben relacionant amb alteracions de l'activitat antioxidant de la GPx (Artuch, 2004; Gassió, 2008).

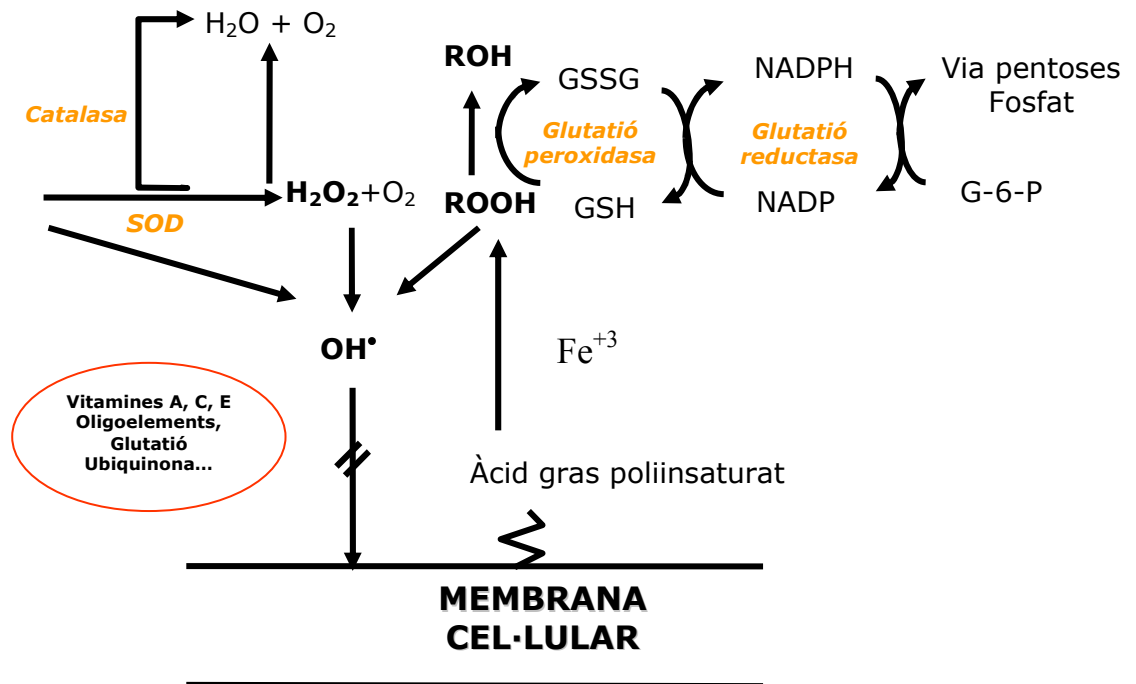


Figura 1. Espècies reactives d'oxigen i de nitrogen i reaccions implicades en la defensa antioxidant. GSSG: glutatió oxidat; GSH: glutatió reduït; NADPH: nicotina adenina dinucleòtid fosfat (forma reduïda); NADP: nicotina adenina dinucleòtid fosfat (forma oxidada); NO: òxid nítric; ONOO⁻: peroxinítric.

Actualment i en eucariotes, ja hi ha identificades més de 25 selenoproteïnes però s'espera que n'existeixin entre 30 i 50. La importància de les selenoproteïnes va quedar confirmada quan ratolins knock-out pel gen de Sec-tRNA morien ja en el període embrionari (Schweizer, 2005). Es demostra d'aquesta manera que la importància de les selenoproteïnes va més enllà d'una activitat o funció concreta. Així, quan es parla d'una alteració en l'estat del Se s'ha de pensar que les conseqüències poden ser diverses i afectar teixits de naturalesa molt variable, per tant, s'espera que les malalties relacionades amb l'estat del Se puguin ser a priori molt diverses.

2- Els ECM com a model de malaltia amb deficiència de Se

- Antecedents (dèficits ja demostrats de Se en ECM)

- Efecte potencial del dèficit de Se en la funció neurològica (defecte de Se relacionat amb dèficits neurològics en la PKU)

Els errors congènits del metabolisme (ECM) són un grup heterogeni de desordres genètics que afecten diferents vies metabòliques de diferents òrgans (incloent el metabolisme intermediari, el metabolisme energètic mitocondrial, el lisosomal o el peroxisomal entre d'altres). Els pacients amb ECM que pateixen aminoacidopaties o acidúries orgàniques es poden beneficiar d'un tractament dietètic. Aquest es basa principalment en una restricció de proteïnes naturals i suplement amb vitamines i micronutrients provinent de fórmules especials (Saudubray, 1995; Acosta, 1996). Tot i aquesta dieta amb suplement, en algunes malalties es continuen descrivint pacients amb defectes lleus, tant de vitamines com de micronutrients.

Entre els ECM, la fenilcetonúria en particular és una de les malalties més estudiades i les deficiències de Se associades al tractament dietètic han estat descrites per diversos autors (Lombeck, 1984; Darling, 1992; Acosta, 1999). A més a més, el dèficit d'aquest element s'ha associat a una alteració de la funció antioxidant així com a una alteració de l'estat de les hormones tiroïdals (Wilke, 1992; Sierra, 1998; Van Bakel, 2000). En principi, els suplement amb Se i altres micronutrients semblen resoldre aquests problemes. De totes maneres, al ser un tractament crònic en el que l'acompliment és baix, especialment en pacients adolescents i adults, els valors de Se poden no arribar a normalitzar-se (Brenton, 2000). D'altra banda i en el cas particular

de la PKU, s'ha suggerit que un dèficit crònic de Se podria estar associat a trastorns neuropsicològics com per exemple el dèficit d'atenció (Gassió, 2008). Per tant, es podria pensar que un dèficit crònic de Se podria tenir implicacions en certes funcions del SNC, no només en la PKU sinó en altres malalties metabòliques amb tractaments dietètics restringits en proteïnes. Altres ECM que requereixen tractament dietètic i que per tant són també candidats a presentar deficiències de Se són per exemple el grup de pacients amb defectes del cicle de la urea, altres aminoacidopaties i acidúries orgàniques. En aquests casos en concret no existeixen estudis sistemàtics fets en poblacions nombroses per tal de valorar el seu estat nutricional, més enllà d'alguns estudis anecdòtics (Barschak, 2007; Yannicelli, 1992).

Dintre dels ECM existeix un tercer grup de pacients, aquells que no requereixen tractament dietètic (pacients amb malalties mitocondrials o lisosomals) dels quals tampoc existeixen estudis que permetin valorar l'estat de Se. Cal remarcar a més, que l'estat clínic d'alguna d'aquestes malalties pot ser tan greu que l'estat nutricional del pacient se'n pot veure compromès.

Els efectes que una possible alteració de Se pugui tenir sobre aquestes malalties de naturalesa tan diversa és encara un enigma, i totes i cada una d'elles podrien servir com a model de malaltia amb deficiència de seleni com a conseqüència d'un defecte nutricional.

3- Estat de Se en el sistema nerviós central avaluat pel LCR

La barrera hematoencefàlica (BHE) és una barrera entre els vasos sanguinis i el sistema nerviós central que impedeix que les substàncies tòxiques la travessin, a l'hora que permet el pas de nutrients i oxigen. Es coneix que el pas de Se des dels teixits

perifèrics cap al SNC es dona de forma especial a través d'aquesta estructura anatòmica (Richardson, 2005). A més a més, les cèl·lules de la BHE tenen transportadors específics que transporten de forma activa substàncies necessàries pel correcte funcionament del cervell, com per exemple la glucosa. Per la seva part, el plexe coroïdal és un teixit vascular d'origen epitelo-endotelial que forma part del sistema ventricular del cervell vertebrat i constitueix la barrera hematorraquídia que separa la sang dels compartiments del líquid cefaloraquidi (**Figura 2**). Les seves funcions principals inclouen nutrició, producció del líquid cefaloraquidi, protecció del cervell (especialment de toxines), homeòstasi i senyalització bidireccional entre d'altres (Wolburg, 2010).

SISTEMA VENTRICULAR DEL CERVELL HUMÀ

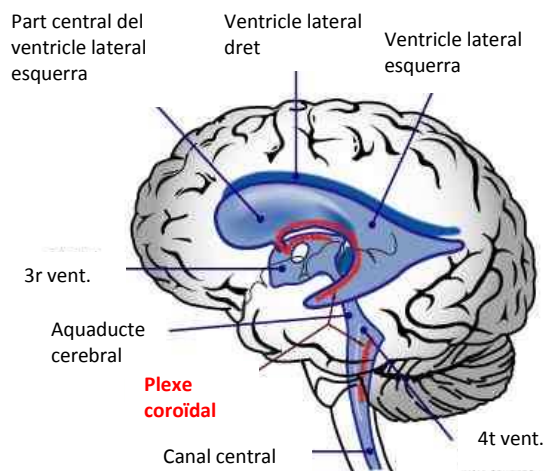


Figura 2. Representació de la localització anatòmica del plexe coroïdal al SNC.

Pel que fa a les necessitats cerebrals, sembla que el cervell seria altament sensible a les aportacions de Se. La SeP cerebral, a part de cobrir les necessitats cerebrals de Se, serviria també com una font puntual de Se en cas de que n'existís un dèficit en la resta de l'organisme. Aquest fet seria possible gràcies a que les cèl·lules cerebrals estan separades de la resta de l'organisme per la BHE, tot provocant un gradient de Se i provocant que les concentracions a tots dos espais siguin diferents. De totes maneres, el transport i el pas de Se a través de la BHE és un procés que resta encara per clarificar. Sembla que en condicions fisiològiques, la incorporació de Se a nivell central implica a la SeP plasmàtica com a donadora de Se al cervell a través de les cèl·lules endotelials de la BHE (**Figura 3**). És en aquestes cèl·lules on un enzim anomenat selenocistein liasa alliberaria el Se, que finalment es convertiria novament en SeP cerebral. Aquest intercanvi és dinàmic i quan les concentracions cel·lulars de Se són baixes, les formes extracel·lulars de Se com la SeP plasmàtica poden incorporar-se a nivell cerebral per així assegurar nivells adequats de Se cerebral (Richardson, 2005).

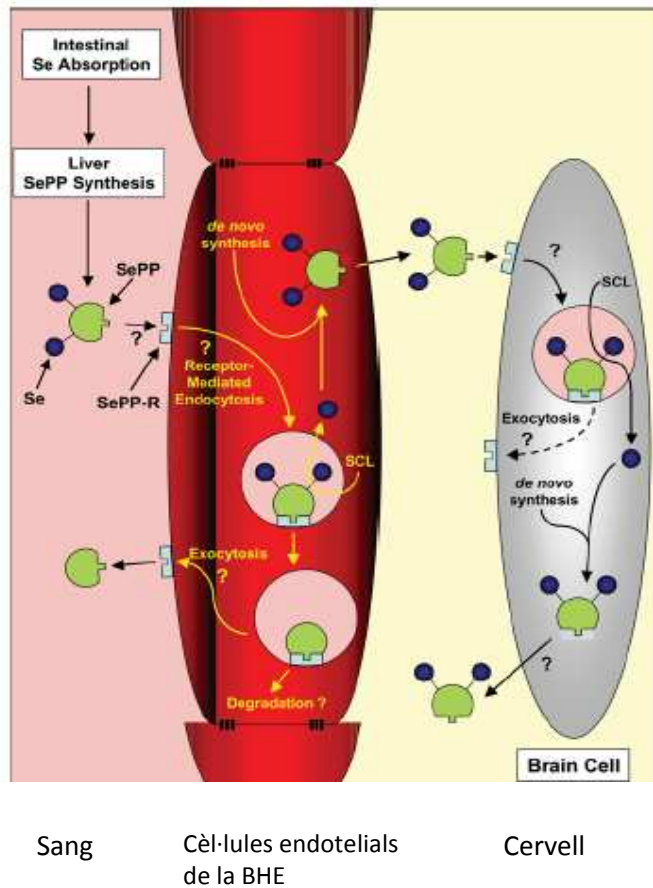


Figura 3. Representació esquemàtica del cicle de la selenoproteïna. El fegatge captura el Se de la dieta que s'utilitza per la síntesi de SeP. El seu alliberament al plasma permet l'ús del Se per part dels teixits perifèrics. La SeP cediria el Se a les cèl·lules mitjançant un receptor específic. El transport de Se a través de la BHE es donaria de forma semblant on el Se s'alliberaria a nivell de les cèl·lules endotelials de la BHE gràcies a la selenocisteïn liasa. De totes maneres, alguns passos d'aquesta via queden encara per resoldre (Richardson, 2005).

Com s'ha explicat anteriorment, l'homeòstasi del Se està altament regulada a nivell del SNC (Burck, 2003) i estudis previs ja suggereixen que l'estat del Se a nivell central és independent de les concentracions plasmàtiques de Se (Forte, 2004; Richardson, 2005). En cas de trobar-se el Se baix a nivell perifèric, el cervell prioritza la seva conservació a nivell cerebral. Aquest fet converteix el cervell en un òrgan

privilegiat pel que fa a l'aportació de Se, i tal i com s'ha explicat anteriorment, suggereix un paper vital de les selenoproteïnes en la funció cerebral (Chen, 2003).

D'aquesta manera es justifica que les necessitats que ens plantejava aquesta tesi anessin més enllà de la valoració de l'estat de Se a nivell perifèric. Un dels principals objectius d'aquest treball era la valoració de l'estat de Se en pacients pediàtrics amb malalties neurològiques. Així, tota la bibliografia consultada ens indicava que per valorar l'estat de Se cerebral no era suficient estudiar el Se a nivell perifèric ja que les concentracions entre els dos espais eren independents. El que s'havia de mesurar era la concentració d'aquest en líquid cefaloraquídi.

4- Avaluació de l'estat de Se en líquid cefaloraquídi en pacients amb trastorns neurològics

L'estat de Se cerebral s'ha investigat només en pacients adults afectats de desordres neurològics crònics com Alzheimer, Parkinson, esclerosi múltiple o alguns tumors cerebrals (Alimonti, 2007; Meseguer, 1999; Forte, 2004).

En general, l'estrès oxidatiu així com la generació de ROS (espècies oxigen-reactives) són 2 components fortament implicats en un nombre important de desordres neuronals i neuromusculars que inclouen infarts i malalties cerebrovasculars, Alzheimer, Parkinson, esclerosi lateral amiotròfica i distròfia muscular de Duchenne (Chen, 2003). El Se confereix protecció envers el dany dels radicals lliures a través d'enzims amb funció peroxidasa com el GPx. Aquest fet li conferiria un paper clau en la fisiopatologia d'aquestes malalties neurològiques. També s'ha demostrat que una biodisponibilitat disminuïda de Se per part del cervell

estaria implicada en la patogènesi de les malalties neurodegeneratives i el procés normal d'envelliment.

Tot i els estudis que existeixen sobre l'estat de Se en poblacions adultes afectades d'algun procés neurodegeneratiu, no existeix literatura sobre l'estat de Se en LCR en poblacions pediàtriques, i encara menys en poblacions pediàtriques afectades d'algun desordre metabòlic de base genètica coneguda o desconeguda, o d'etiologia adquirida. Així, l'estudi d'aquest camp sembla prometedor, primer, perquè per a realitzar el nostre treball disposem de més de 1350 LCR de pacients amb diagnòstic i sense diagnòstic, i segon, perquè com s'ha anat explicant al llarg de la introducció, el control de l'estat de Se cerebral sembla prou important com per poder trobar-se reduït en aquest grup de pacients, bé de forma primària o secundària.

5- Paper del Se en el SNC (regulació de la síntesi de dopamina i toxicitat)

El SNC no només es pot veure afectat per un dèficit crònic de Se sinó que també és sensible a la seva toxicitat. En humans causa principalment alteracions del sistema nerviós com per exemple atàxia, descoordinació motora, hiperreflèxia, tremolor, depressió, irritabilitat i letargia (Wilber, 1980). A part, el fet que existeixi una regulació estreta del pas de Se a nivell de la barrera hematoencefàlica i que les concentracions entre les matrius plasma i LCR siguin tan diferents fa pensar que petites variacions en la concentració cerebral de Se puguin tenir efectes importants tant per dèficit com per excés. D'altra banda, alguns estudis en models animals han suggerit que més enllà del seu paper antioxidant, el Se podria potenciar la biosíntesi i les funcions de la dopamina (Rasekh, 1997; Tsunoda, 2000). Aquesta observació encara no s'ha reportat en pacients amb desordres neurològics, com tampoc s'ha reportat el

paper patogènic de l'excés de la funció dopaminèrgica relacionada amb l'estat de Se. Existeixen nombrosos estudis que relacionen els valors de Se i el recanvi de dopamina en models animals. Alguns treballs refereixen que el Se provocaria una elevació significativa de la concentració sinàptica de dopamina però no d'altres amines biògenes, alhora que potenciarà la funció de la dopamina a través de l'estimulació de Se en els receptors D2 (Rasekh, 1997). Altres afirmen que el Se podria augmentar l'activitat de la tirosina hidroxilasa (enzim que intervé en el primer pas de la síntesi de dopamina (Castaño, 1997)). N'hi ha que també associen un augment en els metabòlits de la dopamina a nivell del cos estriat amb la ingesta de formes inorgàniques de Se, suggerint que aquests canvis tindrien un increment seleno-específic de l'activitat neuronal de les vies dopaminèrgiques (Tsunoda, 2000). Finalment, Ammar i Watanabe suggereixen que la toxicitat del Se en models animals provocaria un increment de la funció dopaminèrgica, que, al mateix temps, estaria relacionada amb canvis de comportament i trastorns motors (Ammar, 1981; Watanabe, 1990).

Aquests estudis en animals d'experimentació obren una porta a pensar que en humans podrien donar-se processos similars. Així, l'estudi de Se a nivell cerebral no hauria de ser una mesura aïllada i puntual, sinó que idealment s'hauria de complementar amb l'estudi de les concentracions de les diferents amines biògenes i dels seu metabòlits a nivell de LCR. Tot per veure si entre ells existeix una relació, i com aquesta podria explicar part de la clínica dels pacients estudiats.

6- Tècniques per a la determinació de Se en matrius biològiques

En aquests últims anys, s'ha desenvolupat en els laboratoris clínics l'aplicació de l'espectrometria de masses amb font de plasma acoblada (ICP-MS) (**Figura 4**) i alguns

treballs científics han demostrat àmpliament la qualitat analítica d'aquest procediment (Mahalingam, 1997; Bocca, 2005; Hsiung, 1997). L'instrument presenta certes avantatges quan es compara amb altres procediments, com per exemple límits de detecció baixos, anàlisi multielemental, ús d'un volum reduït de mostra, alta sensibilitat i ampli marge de detecció. L'aplicació d'aquesta tecnologia en estudis nutricionals pot ser especialment útil en poblacions pediàtriques ja que permet l'avaluació simultània de diferents elements en un volum de mostra limitat.



Figura 4. Agilent 7500ce ICP-MS.

Breument, l'aparell consta d'un nebulitzador que utilitza gas argó per a la introducció de la mostra. Una vegada la mostra es nebulitza es produeix una combustió a la font de plasma que allibera i ionitza els elements de les matrius biològiques. A partir d'aquí, existeix un primer sistema d'eliminació d'interferències que és la cèl·lula de col·lisió/reacció amb hidrogen per a la determinació de seleni (**Figura 5**). La mostra arriba després al quadrupol on es fa la selecció dels elements a

analitzar. Finalment, aquests passaran al detector on s'identificaran en funció de la seva relació càrrega/massa.

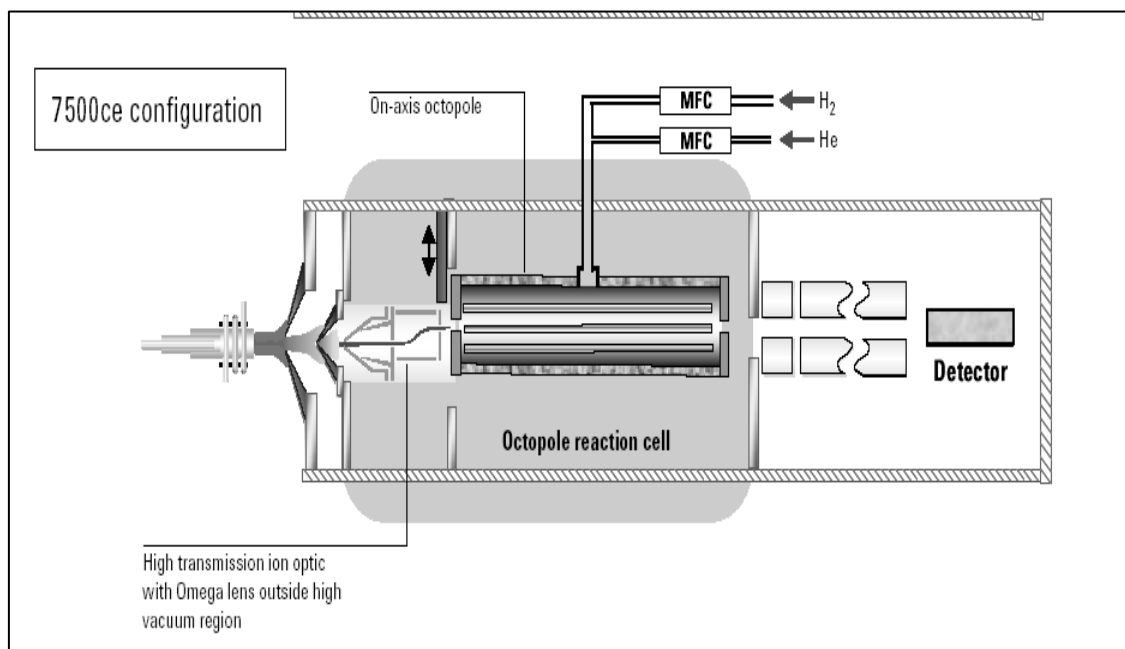


Figura 5. Esquema de l'aparell i de la cèl·lula de col·lisió/reacció

El fet de disposar d'aquesta tecnologia tan evolucionada per a la determinació d'elements traça permet que es pugui fer un estudi ràpid de diferents matrius biològiques. En aquest sentit, aquesta tecnologia proporciona l'aparell ideal per a l'estudi que ens plantejàvem fer en aquesta tesi.

JUSTIFICACIÓ DE LA UNITAT TEMÀTICA I HIPÒTESI

1- Justificació de la unitat temàtica

2- Hipòtesi

1. Justificació de la unitat temàtica

Des de ja fa uns anys, els oligoelements s'han associat a múltiples trastorns, arribant a ser d'especial importància en el seguiment dels pacients amb ECM. En aquest treball, la nostra atenció s'ha centrat principalment en el Se. Els motius són en primer lloc la deficiència ja anteriorment demostrada que es pot observar en varis ECM amb restricció proteica, i en segon lloc, la importància d'aquest element en la regulació de la funció biològica de més de 20 selenoproteïnes amb papers destacats pel metabolisme cel·lular.

El primer pas per dur a terme aquest treball era l'estudi de l'estat general de Se en sang, juntament amb altres oligoelements, en pacients amb ECM amb i sense tractament dietètic restringit en proteïnes. Un cop es va comprovar i confirmar que en els ECM amb restricció dietètica el Se era deficient en un nombre important de pacients, el següent pas era tractar d'estudiar si aquest defecte estava present en malalties neurològiques greus, ja que s'ha demostrat que el dèficit de Se pot alterar algunes funcions neurològiques. Així, el primer pas era estudiar l'estat fisiològic de Se en mostres de LCR en pacients sense afectació neurològica per a l'establiment de valors de referència per després estudiar l'estat de Se en aquest mateix espècimen en pacients amb diferents trastorns neurològics i comprovar si les alteracions en les concentracions de Se podrien estar relacionades amb la fisiopatologia de les malalties.

2. Hipòtesi

El Se és un oligoelement que pot estar deficient en pacients amb ECM que segueixen un tractament dietètic restringit en proteïnes i, en principi, no s'hauria de

trobar deficient en pacients sense dieta. El cervell és un òrgan protegit contra el dèficit de Se, per la qual cosa s'esperaria que una alteració del Se a nivell central pogués tenir conseqüències negatives en la fisiopatologia de diferents trastorns neurològics i en la seva evolució. Paral·lelament, una alteració primària en l'estat de Se a nivell central podria estar associada a trastorns neurològics de diferent origen. L'estandardització de l'anàlisi de Se en LCR i l'establiment de valors de referència per primera vegada en una població pediàtrica ens permetrà estudiar pacients amb trastorns neurològics greus i detectar tant els estats d'excés com els de deficiència de Se que fins ara no han estat demostrats en pacients neuropediàtrics.

OBJECTIUS

1- Objectiu principal

2- Objectius concrets

1- Objectiu principal

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat estudiar l'estat del Se en sang i LCR de pacients amb ECM amb tractament dietètic i altres trastorns neuropediàtrics greus de diferent etiologia.

2- Objectius concrets

A) Estandardització i validació de procediments analítics per a la determinació de Se i altres elements en sang i establiment de valors de referència propis en una població pediàtrica. Estudi de l'estat de Se en sang en pacients amb ECM amb tractament dietètic i sense tractament.

B) Estandardització i validació de procediments analítics per a la determinació de Se en LCR i establiment de valors de referència en una població pediàtrica.

C) Determinació de la concentració de Se en LCR així com la seva relació amb altres marcadors bioquímics en LCR en pacients amb trastorns neuropediàtrics majoritàriament amb diagnòstic etiològic.

D) Estudi de les implicacions diagnòstiques i fisiopatològiques de l'excés de seleni en la síndrome de Kearns-Sayre.

PACIENTS, MATERIAL I MÈTODES

1- Pacients

Població d' estudi per a la determinació de Se en sang: valors normals i de pacients amb ECM

Població d' estudi per a la determinació de Se en LCR: valors normals i de pacients amb ECM

Població de pacients amb la síndrome de Kearns-Sayre

Aspectes ètics

2- Mètodes analítics

Extracció de la mostra: sang i LCR. Criteris d'exclusió

Anàlisis automatitzats en LCR (proteïnes i albúmina)

Anàlisi de Se en sang i LCR

Anàlisi d'amines biògenes en LCR

Determinació de l'activitat de GPx

Determinació de la concentració de 5-MTHF en LCR

3- Mètodes estadístics

Validació dels procediments analítics

Anàlisi estadístic

1- Pacients

Població d' estudi per a la determinació de Se en sang: valors normals i pacients amb ECM.

Població control

Es van estudiar 92 pacients (rang d'edat 1 dia – 42 anys; mitja 6,5 anys) que van acudir al nostre centre per intervencions quirúrgiques menors. Els controls de més de 18 anys van ser voluntaris sans del nostre propi centre.

Criteris d'exclusió:

- Presència de malalties agudes o cròniques
- Tractaments farmacològics
- Dietes especials

Pacients

S'han estudiat 72 pacients amb diferents ECM (rang d'edat 2 mesos - 44 anys; mitja 10,5 anys). Tots ells estaven sota bon control metabòlic en el moment de l'estudi.

Aquests pacients es van classificar en 2 grups:

- Pacients amb dieta restringida en proteïnes (n = 48; rang d'edat 4 mesos - 44 anys; mitja 12,0 anys). D'aquests pacients, els diagnòstic són: 27 PKU, 12 defectes del cicle de la urea i 9 errors congènits del metabolisme intermediari d'àcids orgànics i d'aminoàcids (2 acidúries glutàriques tipus I, 1 acidúria

propionica, 1 acidúria metilmalònica, 3 homocistinúries clàssiques, 1 tirosinèmia tipus I i 1 malaltia de xarop d'auró).

- Pacients sense dieta restringida en proteïnes (n = 24; rang d'edat 2 mesos – 23 anys; mitja 7 anys). D'aquests pacients, els diagnòstics són: 5 hiperfenilalaninèmies lleus, 7 defectes de la fosforilació oxidativa mitocondrial, 2 defectes de la β -oxidació d'àcids grassos, 2 cistinosis, 4 malalties lisosomals, 3 galactosèmies i 1 fructosúria.

Població d' estudi per a la determinació de Se en LCR: valors normals i de pacients amb ECM.

Població control

Els valors de referència es van establir en 89 pacients (rang d'edat 1 dia – 18 anys; mitja 4,4 anys), que van ser sotmesos a una punció lumbar d'urgència per al diagnòstic de diferents malalties (principalment meningitis bacteriana o vírica). Es van seleccionar 21 pacients més (rang d'edat 1 mes – 17 anys; mitja 3,2 anys) als que se'ls va extreure simultàniament sang i LCR per determinar la relació Se LCR/Se plasma.

Criteris d'exclusió:

- Presència de malalties cròniques
- Dietes especials
- Diagnòstic de meningitis vírica i encefalitis vírica o bacteriana

Pacients

Es van estudiar 172 pacients pediàtrics amb diferents malalties neurològiques (rang d'edat 1 dia – 18 anys; mitja 3,5 anys). Es van classificar clínicament aquests 172 pacients en diferents grups segons els seus diagnòstics etiològics:

- Pacients amb errors congènits del metabolisme intermediari (n=12), errors congènits de molècules complexes (n=8), trastorns del metabolisme energètic mitocondrial (n=15), síndromes genètics com Rett i Angelman i/o pacients amb trets dismòrfics (n=19), malalties isquèmiques o hemorràgiques (n=24), processos inflamatoris / infecciosos / expansius del sistema nerviós central (n=9), retard psicomotor (n=10), trastorns del moviment (n=9), epilèpsia i encefalopaties epilèptiques sense diagnòstic etiològic definit (n=35), atàxia (n=12), i altres malalties incloent pacients amb retràs mental i condicions psiquiàtriques com ara desordres de l'espectre autista i episodis psicòtics (n=19).

Criteris d'exclusió:

- Presència de defectes genètics primaris que condueixen a valors disminuïts d'HVA i que reflectirien deficiència de dopamina (deficiència de tirosina hidroxilasa, deficiències en el metabolisme de pterines i metabolisme de B6 i deficiència de descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics). També es van excloure els pacients amb la síndrome de Kearns-Sayre. Aquests es van tractar com un grup apart ja que tenien un increment molt notable dels valors d'HVA i Se (veure apartat següent).

Població de pacients amb la síndrome de KSS

Pacients

Es van estudiar 7 pacients afectats amb la síndrome de Kearns Sayre (rang d'edat 7 - 34 anys; mitja 16 anys). Tots aquest pacients es van diagnosticar clínica i bioquímicament i es van confirmar amb l'estudi genètic. Tots ells presentaven delecions de diferent mida i localització a nivell del DNA mitocondrial. Aquests pacients es van reclutar en diferents centres del territori espanyol (*Hospital Central d'Astúries, Hospital 12 de Octubre i Hospital Sant Joan de Déu*).

Aspectes ètics

L'estudi dels pacients i controls es va realitzar d'acord amb la declaració de Helsinki de 1964 revisada l'any 2000. El comitè d'ètica de l'Hospital Sant Joan de Déu va aprovar l'estudi. Per tots els estudis genètics, es va recollir un consentiment informat signat pels pares dels malalts o pel seus tutors.

2- Mètodes analítics

A) Extracció de la mostra: sang i LCR. Criteris d'exclusió

B) Anàlisis automatitzats en LCR (proteïnes i albúmina)

C) Anàlisi de Se en sang i LCR

D) Anàlisi d'amines biògenes en LCR

E) Determinació de l'activitat de GPx

F) Determinació de la concentració de 5-MTHF en LCR

A) Extracció de la mostra: sang i LCR. Criteris d'exclusió

Per a l'estudi dels elements en sang, la mostra es va recollir en tubs que portaven EDTA com anticoagulant. Posteriorment es van refrigerar a 4°C fins el moment de la determinació analítica.

En casos en els que l'anàlisi de sang és simultani al de la determinació de Se en LCR (objectiu 2), s'extrau la sang uns minuts abans segons un protocol prèviament descrit (Ormazabal, 2005), ja que existeixen múltiples variables que influeixen en la concentració dels paràmetres bioquímics en sang i en LCR i que han de ser controlades. La punció lumbar s'ha de fer de 7h a 9h del matí després de 8 a 10 hores de dejú del pacient (en lactants el dejú pot ser de 3 a 5 hores depenent de l'edat). En el LCR existeix un gradient rostrocaudal (la concentració d'alguns metabòlits varia segons la fracció de líquid recollida), per tant és important seguir un ordre a l'hora de recollir la mostra en els diferents tubs: :

- Primer tub (5 gotes) → histoquímica
- Segon tub (10 gotes) → neurotransmissors i Se
- Tercer tub (10 gotes) → pterines i 5-MTHF (tub tapat de la llum)
- Quart tub (10 gotes) → aminoàcids

Un cop obtinguda la mostra, els tubs s'introdueixen en gel i són immediatament traslladats al laboratori per a ser emmagatzemats a -80°C fins el moment de processar-los. Les mostres de LCR que estiguin contaminades de sang degut a una punció traumàtica, s'exclouen de l'estudi per una possible interferència de la major concentració de Se en sang respecte a la de LCR.

B) Anàlisis automatitzats en LCR

Les concentracions de proteïna total i d'albumina en LCR es van analitzar per mètodes automàtics en un Architect c8000 system (Abbott Laboratories, IL, USA).

C) Anàlisi de Se (i altres elements) en sang i LCR

Les mostres tant de sang com de LCR es van analitzar amb un espectròmetre de masses amb font de plasma acoblada (ICP-MS) Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanya). L'instrument utilitza una cèl·lula de col·lisió/reacció amb hidrogen per a la determinació de Se i amb heli per a la determinació de la resta d'elements. De forma breu, després de la ionització de la mostra de sang o de LCR en la font de plasma i posterior eliminació d'interferències en les cèl·lules de col·lisió/reacció, les concentracions dels diferents elements s'analitzen per espectrometria de masses. Aquest procediment ha estat descrit ja anteriorment (Heitland, 2006; Wahlen, 2005). L'anàlisi dels diferents elements es completa en menys de 4 minuts per mostra (**Figura 6**).

Per a l'anàlisi de sang total, després de la recollida de mostres en tubs amb EDTA, aquestes es refrigeren a 4°C fins el moment de l'anàlisi. Dues hores abans, les mostres es porten a temperatura ambient i s'homogeneïtzen delicadament.

200 µl d'aquesta sang es dilueixen 1/20 en una solució que conté:

- 0,7 mmol/L EDTA (Merck, Darmstadt, Alemanya)
- 0,07% Tritó-X-100 (Merck)
- 0,5% amoniac (Merck)
- 10 µg/L de germani i tali com estàndards interns (Merck)

Per a la determinació de la resta d'elements (Co, Cu, Zn, Se, Mn, Mo i Mg), es van adquirir les corresponents solucions d'estàndards externs a Merck, i es van tractar de la mateixa manera que les mostres de sang total. En el cas del Se, la corba de calibratge comprèn concentracions de 0, 1, 2, 3, 4 i 5 µg/L.

En el cas de les mostres de LCR, 100 µl de mostra es dilueixen 1/10 en una solució que conté:

- 0,7 mmol/L EDTA (Merck)
- 0,07% Tritó-X-100 (Merck)
- 2% Butanol
- 0,5% amoniac (Merck)
- 10 µg/L de germani com estàndard intern (Merck)

Es van preparar cinc calibradors de Se a diferent concentració (0, 0,2, 0,4, 0,8 i 1,2 µg/L) contenint a part 10 µg/L de germani com estàndard intern. Posteriorment van ser tractats de la mateixa manera que les mostres de LCR.

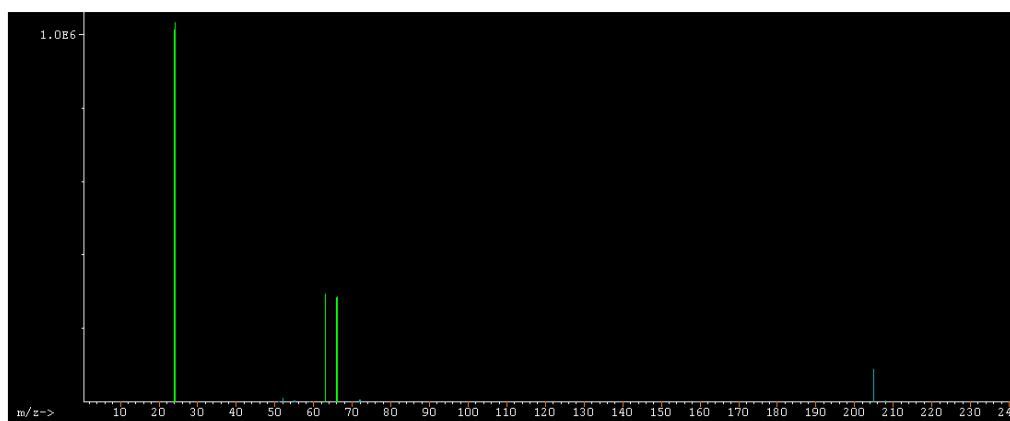


Figura 6. Espectres dels elements analitzats. En l'eix d'abcises apareix el pes atòmic, i en el d'ordenades l'escala de la resposta en mA.

D) Anàlisis d'amines biògenes en LCR

Anàlisi de neurotransmissors en LCR:

La determinació d'amines biògenes (5-HIAA, HVA) es va realitzar mitjançant cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) amb par iònic i detecció electroquímica, segons un protocol prèviament descrit (Ormazabal, 2005) (**Figura 7**).

Reactius

- Acetat sòdic (SigmaSt Louis, MO, EUA)
- Àcid cítric (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- 1-heptà sulfònic (Sigma)
- Metanol absolut per HPLC (ROMIL, Cambridge, UK)

Calibradors

- Àcid 5-hidroxiindolacètic (5-HIAA) (Sigma)
- Àcid homovanílic (HVA) (Sigma)

Condicions cromatogràfiques

- HPLC (Waters, MA, USA) amb detecció electroquímica (coulochem II, ESA, Chelmsford, MA, USA)
- Columna: Nucleosil 100 C18 5µm 25x0,4 (Teknokroma, Barcelona, Espanya)
- Precolumna: ODS 20 x 0.4mm (Teknokroma)
- Fase mòbil: Tampó citrat/acetat sòdic 0,1 mmol/L, pH 4, metanol 9%, EDTA-Na 1,2 mmol/L i 1-heptà sulfònic 1,2 mmol/L
- Flux 1,1 ml/min
- 30 µl volum d'injecció de mostra i patró de calibratge

- Cèl·lula analítica (model 5021) = +400mV; sensibilitat = 200nA

Preparació dels patrons de calibratge

Diluir els calibradors en fase mòbil fins aconseguir les següents concentracions:

5-HIAA → 357 nmol/L

HVA → 362 nmol/L

El processament posterior és igual al de les mostres.

Procediment analític

Dilució (1:2) de les mostres de LCR i patrons de calibratge en fase mòbil.

Centrifugar (10 minuts a 1500 x g a 4°C) i filtrar el sobrenedant (Filtres 0,22µm, Millipore, Bedford, MA, USA) directament en el vial de l'HPLC.

Càlcul de resultats

Els resultats es calculen mitjançant calibratge extern amb el programa d'adquisició de dades cromatogràfiques Breeze 3.3 GP software (Waters). Els resultats s'expressen en nmol/L.

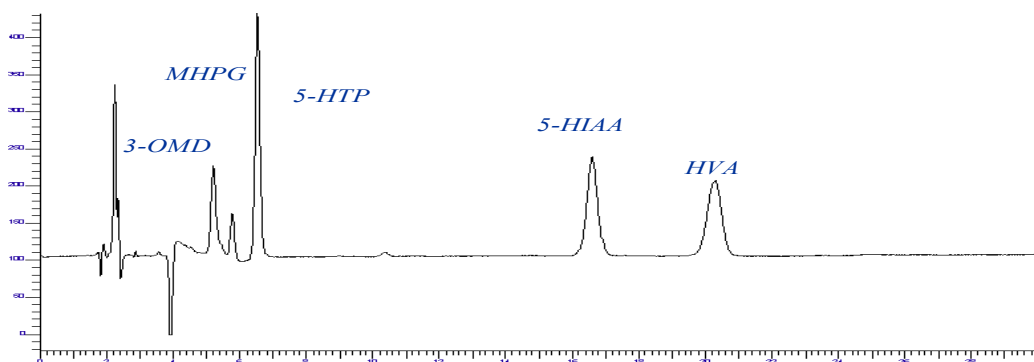


Figura 7. Cromatograma de Patrons de calibratge de NT

E) Determinació de l'activitat de GPx

L'activitat de glutatió peroxidasa es va mesurar segons el mètode de Plagia i Valentine (Plagia, 1967). L'assaig per l'estudi del GPx inclou el t-butilhidroperòxid que reacciona amb el glutatió reduït, originant t-butanol i glutatió oxidat. Aquest últim és constantment reduït per un excés de glutatió reductasa, proporcionant una concentració constant de glutatió reduït que alhora provoca l'oxidació del NADPH.

Reactius

- NADPH (Sigma-Aldrich)
- Glutatió reduït (Sigma-Aldrich)
- t-butilhidroperòxid (Sigma-Aldrich)
- NaHCO₃ (Sigma-Aldrich)
- Tampó fosfat (Sigma-Aldrich)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- Azida sòdica (VWR International Eurolab)
- Reactiu de Drabkin (Roche Diagnostics)

Procediment analític

Barregem 100 µl d'hemolitzat amb 100 µl del reactiu de Drabkin i ho deixem reaccionar durant 5 minuts de tal manera que l'hemoglobina passi a cianometahemoglobina estable. A continuació es dilueix la mostra amb tampó fosfat fins a obtenir una concentració final d'hemoglobina de 2 g/l aproximadament. S'afegeix azida sòdica al medi de reacció per inhibir la catalasa endògena ja que el cianur del reactiu de Drabkin és insuficient per a la seva total inhibició.

Càlcul de resultats

Les unitats de l'activitat enzimàtica es van calcular utilitzant un coeficient d'extinció milimolar per a NADPH.

F) Determinació de la concentració de 5-MTHF en LCR

La determinació de 5-MTHF es va realitzar per un procediment d'HPLC amb detecció de fluorescència (Waters) prèviament descrit (Belz, 1994), (**Figura 8**).

Reactius

- Fosfat potàssic monobàsic (Sigma)
- Fosfat potàssic dibàsic (Sigma)
- Trizma Base (Sigma)
- Àcid clorhídric (Merck)
- Àcid ascòrbic (Merck)
- Acetonitril 190 per HPLC (ROMIL)

Calibrador

- 5-metiltetrahidrofolat (MTHF) (Sigma)

Condicions cromatogràfiques

- HPLC amb detecció de fluorescència (Waters)
- Columna: Nucleosil 120 C18 5µm 15x0,4 (Teknokroma)
- Pre-columna: ODS 20 x 0.4mm (Teknokroma)
- Fase mòbil: *Bomba A:* Acetonitril
Bomba B: Tampó fosfat 5mmol/L pH 2,3.

Programa de solvents de la bomba:

Temps (min)	Flux (ml/min)	Bomba A	Bomba B	
5	1	7%	93%	
10	1	13%	87%	gradient
5	1	7%	93%	gradient
5	1	7%	93%	

- Flux 1ml/min
- 20µl volum d'injecció de mostra i patró de calibratge
- Detecció de fluorescència: Excitació = 295 nm, emissió = 355 nm

Preparació dels patrons de calibratge

Diluir el calibrador de 5-MTHF en Tris-HCl fins aconseguir una concentració del rang de les fisiològiques en LCR

5-MTHF → 22 nmol/L

El processament posterior és igual al de les mostres.

Procediment analític

Dilució (1:2) de les mostres o patró de calibratge en 5mg/mL d'àcid ascòrbic diluït en fase mòbil (preparació extemporània). Centrifugar 10 minuts a 1500 x g a 4°C.

Filtrar el sobrenedant (Filtres 0,45µm, Millipore) directament en el vial d' HPLC.

Càlcul de resultats

Els resultats es calculen a través de calibratge extern amb el programa d'adquisició de dades cromatogràfiques Breeze 3.3 software (Waters). Els resultats s'expressen en nmol/L.

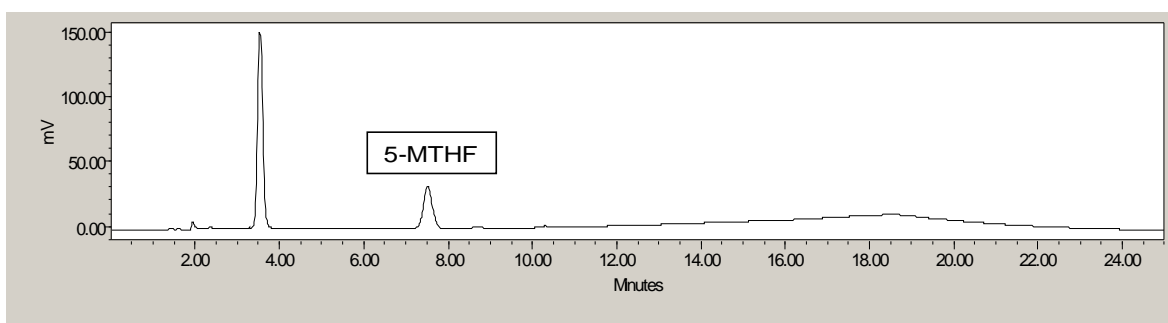


Figura 8. Cromatograma d'un patró de calibratge de 5-MTHF.

3- Mètodes estadístics

Validació dels procediments analítics per a la determinació de Se:

Es van calcular els següents paràmetres:

- Coeficient de variació intrasèrie. Es van analitzar patrons de calibratge a dues concentracions diferents 20 vegades en la mateixa sèrie. El coeficient es va calcular en forma de percentatge dividint la desviació estàndard dels resultats per la mitja aritmètica. $CV = (\text{desviació estàndard} / \text{mitja}) \times 100$.
- Coeficient de variació intersèrie. Es van analitzar patrons de calibratge en 20 sèries en diferents dies. El coeficient es va calcular en forma de percentatge dividint la desviació estàndard dels resultats per la mitja aritmètica (veure punt anterior).

- Interval analític. Es va calcular diluint progressivament el patró de calibratge fins arribar a concentracions no reproduïbles.

Els altres procediments ja havien estat validats al nostre laboratori seguint els mateixos criteris metrològics.

Anàlisi estadístic

Totes les variables clíniques i bioquímiques han estat recollides en una base de dades (Microsoft Excel).

Per als estudis estadístics s'han aplicat bàsicament les següents proves:

- Per a l'estudi de distribució de dades: prova de Kolmogorov-Smirnov
- Per a l'associació entre variables qualitatives: prova de Chi-quadrat
- Per a la comparació de variables quantitatives:

Variables paramètriques:

Prova T de Student per a la comparació de mitjanes

Variables no paramètriques:

Prova de Wilcoxon per a dades aparellades

Prova U de Mann-Whitney per a dades no aparellades

- Proves de correlació simple:

Variables paramètriques:

Prova de Pearson

Variables no paramètriques:

Prova de Spearman

- Proves de regressió lineal múltiple entre una variable dependent i dues o més variables independents, per evitar el factor de confusió de l'edat i d'altres variables importants en l'àmbit pediàtric.

Els detalls de cada una d'aquestes proves figuren en cada un dels articles publicats. Els càlculs estadístics es van realitzar amb el programa SPSS 19.0.

RESULTATS

OBJECTIU 1

- A) Estandardització i validació de procediments analítics per a la determinació de Se i altres elements en sang i establiment de valors de referència propis en una població pediàtrica. Estudi de l'estat del Se en sang en pacients amb ECM amb tractament dietètic i sense tractament.

Monitorization of trace elements in blood samples from patients with inborn errors of metabolism.

Mireia Tondo, Nilo Lambruschini, Lilianne Gómez-López, Alejandra Gutiérrez, Juan Moreno, Angels García-Cazorla, Belén Pérez-Dueñas, Mercé Pineda, Jaume Campistol, Maria A. Vilaseca, Rafael Artuch.

Journal of Inherited Metabolic Diseases 2010; DOI: 10.1007/s10545-009-9015-8.

En aquest primer treball ens plantejàvem l'establiment de valors de referència per a determinats elements traça en una mostra biològica com és la de sang total. La necessitat venia de la inexistència d'estudis sobre l'estat d'aquests elements en poblacions pediàtriques afectades de diferents errors congènits del metabolisme. Es necessitava un aparell que permetés l'estudi simultani dels diferents elements sense utilitzar un gran volum de mostra i l'aparell ideal era un ICP-MS. Per aquest motiu,

prèviament el que calia fer era estandarditzar un procediment analític fiable i reproduïble per a l'anàlisi multielemental.

Per a realitzar l'estudi es van utilitzar els excedents de mostres de pacients que van venir al nostre hospital per a intervencions quirúrgiques menors.

Síntesi de resultats

- Les característiques metrològiques del procediment (coeficients de variació i límit de detecció) per a la quantificació dels diferents elements traça amb finalitats diagnòstiques van ser adequades.
- Els valors de referència per Se, Zn, Co, Cu, Mb i Mn es van estratificar segons l'edat ja que es van observar tant correlacions positives com negatives quan es comparaven els valors obtinguts amb l'edat dels nostres controls.
- Es van observar diferències significatives pel Se i pel Co quan es van comparar els valors obtinguts pels pacients amb tractament dietètic i els valors de referència dels nostres controls (prova ANOVA amb correcció de Bonferroni $p < 0.0001$).
- Es van observar diferències significatives (prova ANOVA amb correcció de Bonferroni $p < 0.0001$) quan es van comparar les concentracions de Se entre els grups de pacients amb ECM amb i sense tractament dietètic.
- La resta d'elements estudiats van mostrar resultats normals en tots els pacients i no es van observar diferències al comparar els diferents grups.

OBJECTIU 2

B) Estandardització i validació de procediments analítics per a la determinació de Se en LCR i establiment de valors de referència en una població pediàtrica.

Selenium concentration in cerebrospinal fluid samples from a paediatric population.

Mireia Tondo, Juan Moreno, Mercedes Casado, Nuria Brandi, Cristina Sierra, Maria A. Vilaseca, Aida Ormazabal, Rafael Artuch.

Neurochemical Research, 2010; 35 (8), 1290-1293.

En aquest segon treball ens plantejàvem l'establiment de valors de referència pel seleni en LCR. La necessitat venia de la inexistència d'estudis sobre l'estat d'aquest element en poblacions pediàtriques i de la potencial associació entre una alteració en les concentracions de Se i algunes funcions neurològiques. A més, la implicació del Se en la síntesi i funció de més de 20 selenoproteïnes feia pensar que era important estudiar les concentracions de Se a nivell del SNC. Per tant calia estandarditzar també un procediment per a la quantificació de Se en LCR emprant un ICP-MS.

Per a realitzar l'estudi es van utilitzar els excedents de mostres de LCR de pacients que van venir al nostre hospital sota la sospita d'una infecció central (meningitis vírica o bacteriana) als quals es va realitzar una punció lumbar que l'estudi microbiològic finalment va descartar.

Síntesi de resultats

- Les característiques metrològiques del procediment (coeficients de variació i límit de detecció) per a la quantificació del Se en LCR amb finalitats diagnòstiques van ser adequades.
- Els valors de referència es van estratificar en 3 grups en funció de l'edat, ja que es va observar una correlació negativa entre els valors obtinguts i l'edat dels nostres controls (test de Pearson $r = -0,476$; $p < 0,0001$).
- Les concentracions de proteïna total i d'albumina en LCR estaven correlacionades positivament amb les concentracions de Se (test de Pearson $r = 0,446$; $p < 0,001$; $r = 0,789$; $p < 0,001$, respectivament).
- Amb l'anàlisi de correlació múltiple es va confirmar que tant l'edat dels nostres controls com els valors de proteïna total estaven correlacionades amb els valors de referència de Se en LCR obtinguts.
- Els valors de Se en LCR correlacionaven positivament amb l'activitat de l'enzim GPx (test de Pearson $r = 0,431$; $p < 0,001$).
- No es va observar correlació entre els valors de Se a nivell plasmàtic i els valors obtinguts en LCR. Els valors de Se en LCR eren aproximadament 30 vegades inferiors als observats en plasma.

OBJECTIU 3

C) Determinació de la concentració de Se en LCR així com la seva relació amb altres marcadors bioquímics en LCR en pacients amb trastorns neuropediàtrics amb diagnòstic etiològic.

Cerebrospinal fluid selenium concentrations in paediatric patients with neurological disorders.

Mireia Tondo, Aida Ormazabal, Mercedes Casado, Mercè Pineda, Jaume Campistol, Belén Pérez-Dueñas, Àngels García-Cazorla, Mercedes Serrano, Rafael Artuch.

En revisió.

Un cop establerts els valors de referència per a una població pediàtrica, el següent pas era l'estudi de l'estat de Se en LCR de pacients afectats amb diferents malalties neurològiques. Estudis anteriors ja deixaven clar que l'homeòstasi del Se al SNC estava altament regulada (Burck, 2003), i nombrosos estudis suggerien que les concentracions de Se entre la sang i el SNC eren diferents. (Richardson, 2005; Tondo, 2010).

L'estat de Se en LCR s'havia investigat en alguns desordres neurològics crònics en pacients adults, com per exemple Parkinson, esclerosis múltiple i la malaltia d'Alzheimer (Meseguer, 1999; Alimonti, 2007; Forte, 2004), on s'hipotetitzava un potencial paper del Se per al desenvolupament d'aquestes malalties. D'altra banda,

estudis previs fets en models animals suggerien que més enllà de les ben conegudes funcions biològiques del Se, aquest també podia potenciar la biosíntesis i les funcions de la dopamina (Rasekh, 1997; Tsunoda, 2000).

De totes maneres, la necessitat d'aquest treball naixia del fet que no existien treballs previs sobre l'estat de Se en LCR en una sèrie llarga de pacient pediàtrics afectats de diferents malalties neurològiques tot i la gran evidència del paper de Se en la fisiopatologia dels desordres del SNC.

Síntesi de resultats

- Divuit dels 172 pacients estudiats presentaven valors alterats:
 - 8 d'ells presentaven valors lleugerament disminuïts de Se compresos entre 0,55 i 0,66 $\mu\text{g/L}$ (mitja 0,62; DS 0,04). Un d'ells patia una malaltia mitocondrial, 2 asfíxia perinatal, 2 encefalopatia epilèptica, 1 tetraparèsia espàstica i 1 infecció congènita causada per citomegalovirus.
 - Deu pacients presentaven valor elevats de Se de 2,3 a 5,4 $\mu\text{g/L}$ (mitja 3,7; DS 1,16). Quatre pacients patien asfíxia perinatal, 3 encefalopatia epilèptica, 2 malalties mitocondrials i 1 síndrome de Rett.
- Entre els 10 casos amb valors elevats de Se, 4 tenien també valors alts de proteïna en LCR (3 casos d'asfíxia perinatal i 1 cas de malaltia mitocondrial).
- Cinc dels 18 pacients amb els valors de Se en LCR alterats presentaven també valors alterats d'HVA en LCR, i 7 d'ells de 5-HIAA.
- Quan es va aplicar el test de Chi quadrat, no es va trobar associació entre els valors de Se en LCR i els valors d'amines biògenes.
- Després d'aplicar un test de correlació simple, es van trobar fortes associacions entre els valors de Se i HVA en LCR ($r = 0,405$; $p < 0,001$), Se i 5-HIAA en LCR ($r = 0,583$; $p < 0,001$), Se en LCR i edat ($r = -0,270$; $p < 0,001$), Se en LCR i activitat de GPx ($r = 0,648$; $p < 0,001$).

- Aquesta correlació entre el Se i les amines biògenes en LCR es perdia després de realitzar un anàlisi múltiple de regressió lineal controlant l'efecte de confusió que exercia l'edat.

OBJECTIU 4

D) Estudi de les implicacions diagnòstiques i fisiopatològiques de l'excés de seleni en la síndrome de Kearns-Sayre.

Biochemical parameters to assess choroid plexus dysfunction in Kearns-Sayre syndrome patients

Mireia Tondo, Ignàcio Málaga, Mar O'Callaghan, Mercedes Serrano, Sonia Emperador, Aida Ormazabal, Eduardo Ruíz-Pesini, Julio Montoya, Elena Martín-Hernández, Maria T García-Silva, Àngels García-Cazorla, Mercè Pineda, Rafael Artuch.

Mitochondrion 2011; PMID: 21745599

El nostre anterior treball ens havia permès observar que existia un grup clarament definit de pacients amb uns valors de Se en LCR permanentment elevats sense una explicació clara. L'única característica comú és que aquests pacients patien malalties mitocondrials per delecions del DNA mitocondrial. Aquest grup de pacients no es van incloure en el treball anterior sinó que es van tractar com un grup apart.

Per aquest objectiu, ens plantejàvem l'estudi d'uns paràmetres bioquímics que ens permetessin detectar la disfunció del plexe coroïdal en pacients afectats de la síndrome de Kearns-Sayre (malaltia mitocondrial que cursa amb delecio del DNA mitocondrial). Els paràmetres escollits per a l'estudi eren proteïnes totals, 5-MTHF, HVA i concentracions de Se. Si bé ja es coneixia que tant les proteïnes com el 5-MTHF

es troben alterades en la síndrome de KSS, no existien referències pel Se i només un únic treball del nostre grup apuntava a la possibilitat d'un augment d'amines biògenes, concretament d'HVA en LCR.

Aquest estudi obriria la porta a l'establiment d'un perfil específic per aquells casos que presentessin disfunció del plexe coroïdal, que semblaria ser un òrgan diana en aquest tipus de malalties.

Síntesi de resultats

- Els valors de Se en LCR es van estudiar en 6 dels 7 pacients diagnosticats de KSS en diferents hospitals en aquests darrers anys, i en tots els casos els valors eren clarament més alts que el límit superior de referència.
- A més a més, els pacients presentaven tant valors elevats d'HVA com de proteïnes, així com valors disminuïts de 5-MTHF en LCR.
- Aquest nou perfil bioquímic sembla ser característic de la síndrome de KSS, ja que dels 1350 LCR analitzats al nostre laboratori en els darrers anys, només s'han detectat amb aquest perfil els 7 casos de KSS.
- L'establiment d'aquest perfil diagnòstic ens va permetre detectar i confirmar un nou cas de KSS que presentava una clínica menys suggestiva, sense la necessitat de recórrer a proves diagnòstiques innecessàries i assolint ara un diagnòstic molt més ràpid.
- Després de practicar-li una biòpsia de múscul al pacient, els estudis genètics van mostrar que aquest presentava una deleció de 5800 pb i 80% d'heteroplàsmia del genoma mitocondrial.

DISCUSSIÓ

1- Discussió conjunta

2- Discussió per temes

1. Discussió conjunta

Una de les nostres principals necessitats pel control regular dels pacients amb malalties metabòliques i tractament dietètic era la monitorització de diferents elements traça en diversos fluids biològics. Tradicionalment s'havien descrit deficiències d'alguns d'aquests elements en aquells pacients que tenen com a base del seu tractament les dietes restrictives en proteïnes (Saudubray, 1995; Acosta, 1996). De tots aquests elements, el Se semblava un candidat ideal i prèviament ja s'havien descrit deficiències en algunes malalties metabòliques, com per exemple la PKU (Lombeck, 1984; Darling, 1992; Acosta, 1999). El nostre grup ja havia demostrat l'associació del dèficit de Se i certes disfuncions neuropsicològiques en pacients PKU (Gassió, 2008). A part, la importància del Se radicava en el fet de ser un element important per al correcte funcionament d'algunes selenoproteïnes essencials (Moghadaszadeh, 2006). Per tant, ens semblava d'interès monitoritzar les concentracions de Se en sang (com a marcador de dèficit nutricional), i en LCR (com a marcador potencial de mecanismes fisiopatològics en malalties d'àmbit neuropediàtric). L'adquisició d'un sistema d'ICP-MS a través de l'*Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)*, ens va permetre iniciar aquests estudis al nostre centre i d'aquesta manera introduir aquesta tecnologia en l'àrea de les malalties rares. Les avantatges d'aquest aparell eren principalment permetre l'anàlisi simultani i multielemental per a una mateixa mostra, ús d'un volum de mostra molt petit (100-200 µl) i rapidesa en l'anàlisi (menys de 5 minuts per mostra).

En aquest tipus de treballs de recerca aplicada que fem al nostre centre, els passos són comuns i comencen amb l'estandardització de procediments, l'establiment de

valors de referència i per últim l'estudi de diferents poblacions seleccionades amb diferents malalties.

2. Discussió per temes

Estandardització i validació de procediments analítics per a la determinació de Se i altres elements en sang i establiment de valors de referència propis en una població pediàtrica. Estudi de l'estat del Se en sang en pacients amb ECM amb tractament dietètic i sense tractament.

Les característiques metrològiques del procediment (coeficient de variació i límits de detecció) per a la quantificació dels diferents elements traça amb finalitats diagnòstiques van ser adequades segons les especificacions de qualitat del nostre laboratori (acreditat per la norma ISO 15189; ENAC).

Els valors de referència per Se, Zn, Co, Cu, Mb i Mn es van estratificar segons l'edat ja que es van observar tant correlacions positives com negatives quan es correlacionaven els valors obtinguts amb l'edat dels nostres controls. A part, els nostres valors coincidien amb aquells descrits prèviament en altres poblacions principalment adultes però també pediàtriques (Gropper, 1988; Molina, 1998; Forte, 2004; Alimonti, 2007).

Es coneix que alguns pacients amb ECM poden presentar deficiències en vitamines i elements traça (ja que en molts casos el seu tractament consisteix en una dieta restringida en proteïnes) (Saudubray, 1995; Acosta, 1996). En alguns pacients, especialment en els PKU, aquest tipus de deficiències ja havien estat anteriorment

descrites (Lombeck, 1984; Darling, 1992; Acosta, 1999). De totes maneres, aquest treball era pioner pel fet d'estudiar simultàniament diferents elements traça en sang total tant en pacients diagnosticats d'ECM amb restricció dietètica com en pacients amb dieta lliure. Pel Se en concret, la seva deficiència és important perquè aquest element està implicat en diferents enzims del sistema antioxidant i del metabolisme hormonal entre d'altres (Moghadaszadeh, 2006). En referència als nostres resultats, la ingesta diària mitja de Se en els pacients PKU estudiats era lleugerament superior a les recomanacions dietètiques. Per tant, tot i la fórmula especial enriquida en Se, un nombre important de pacients no arribava als valors normals de Se si bé en tots els casos la deficiència era lleu. Els valors disminuïts de Se es van observar en altres grups amb ECM amb dieta restringida en proteïnes (desordres del cicle de la urea i acidèmies orgàniques). Aquests resultats reforcen la hipòtesi d'una baixa biodisponibilitat del Se quan s'aporta en fórmules artificials. De fet, ja s'ha demostrat que segons la forma de presentació del Se (orgànic o inorgànic), la biodisponibilitat varia de forma important (Van Dael, 2001). Per altra banda, pacients amb altres ECM sense tractament dietètic, com desordres lisosomals o fins i tot pacients amb fenotips molt greus com ara encefalopaties mitocondrials i amb dificultats d'alimentació, no van mostrar aquesta deficiència de Se.

Cal destacar el cas del Co, ja que alguns pacients amb ECM i tractament dietètic presentaven també valors lleugerament més baixos de Co respecte als valors de referència. Igual que en el cas del Se, aquests pacients tenien unes ingestes diàries de Co superiors a les recomanacions dietètiques. De totes maneres, la millor manera per avaluar l'estat del Co en l'organisme és a través de la determinació de cobalamina, ja

que aquesta és la principal forma biològicament activa en humans (Herrero, 1998). Així, l'estudi de l'estat de Co en l'organisme i els resultats trobats tindrien una repercussió clínica i dietètica d'importància limitada.

Malgrat que alguns d'aquests pacients presentaven malalties molt greus, la resta d'elements (Zn, Cu, Mg, Mn i Mo) mostraven valors normals en totes les diferents poblacions estudiades, tant les que seguien dieta com les que no. Així, quedava clar que el Se era l'element més afectat en pacients amb malalties metabòliques i dieta restringida en proteïnes, per tant, la seva monitorització semblava important i del tot justificada.

Estandardització i validació de procediments analítics per a la determinació de Se en LCR i establiment de valors de referència en una població pediàtrica.

Partint de la base de que no existien estudis previs sobre l'estat de Se a nivell central en poblacions pediàtriques, el pas següent era estandarditzar la determinació de Se en un espècimen diferent com el LCR. Les característiques metrològiques del procediment (coeficients de variació i límit de detecció) per a la quantificació del Se en LCR amb finalitats diagnòstiques van ser adequades. Els valors de referència es van estratificar en 3 grups en funció de l'edat, ja que es va observar una correlació negativa entre els valors obtinguts i l'edat dels nostres controls. Es va observar que aquests valors estaven més elevats en la població de nounats que en la resta.

En referència als estudis de correlació, va ser interessant observar que no existia relació entre les concentracions de Se en sang i les de LCR. En canvi, es va

observar que els valors de proteïna total estaven associats a les concentracions de Se en LCR, suggerint que una fracció important del *pool* de Se del LCR va lligat a l'albumina. Per tant, i coneixent que les concentracions de Se en plasma són molt més elevades que les del LCR, s'hauria d'esperar que les concentracions de Se augmentessin en aquells casos en els que s'alterés la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica. L'estreta regulació que es produiria a nivell central (ja que les concentracions del plasma eren aproximadament 30 vegades superiors a les observades pel mateix pacient en LCR), reforça la importància de l'homeòstasi del Se cerebral, tant per evitar efectes tòxics com deficiències d'aquest element a nivell de sistema nerviós central (Richardson, 2005). Aquesta primera aproximació a l'estat del Se cerebral en població control ens obria les portes per a l'estudi dels valors de Se en LCR en pacients afectats de malalties metabòliques de causa diversa. Cal recordar que en el primer treball d'aquesta tesi es demostra que un nombre important de pacients amb aquestes malalties i tractament dietètic, especialment els pacients PKU, presentaven de forma repetida valors baixos de Se a nivell perifèric.

Encara que la investigació de la fisiopatologia del Se en relació a la funció de les selenoproteïnes no és un objectiu principal d'aquest treball, es va voler analitzar si els valors de Se correlacionaven amb l'activitat d'una d'aquestes: la GPx, i, efectivament es va trobar una associació positiva. Aquesta confirmació dóna èmfasi al fet de que la quantificació de Se a LCR reflexa com a mínim una de la seves funcions, l'antioxidant, donant suport a treballs previs en els quals ja es demostrava que els valors de Se en plasma correlacionen amb l'activitat GPx i l'activitat de la trio deionotidasa (Van Bakel, 2000).

Determinació de la concentració de Se en LCR així com la seva relació amb altres marcadors bioquímics en LCR en pacients amb trastorns neuropediàtrics amb diagnòstic etiològic.

Aquest és el primer estudi sobre valors de Se en LCR fet en una població pediàtrica afectada de diferents malalties neurològiques. L'establiment previ de valors de referència per a una població pediàtrica (Tondo, 2010) ens va permetre identificar casos amb valors disminuïts i augmentats de Se en LCR.

Referent als valors de Se en LCR, 18 de 172 els van presentar alterats. D'aquests, 8 els presentaven lleugerament disminuïts quan es van comparar amb els de la nostra població de referència. Els perfils clínics d'aquests pacients eren heterogenis, fet que condueix a pensar que aquesta observació té una importància clínica i bioquímica limitada. Existeixen estudis semblants en poblacions adultes afectades de malalties neurodegeneratives on s'ha observat també valors lleugerament disminuïts de Se a nivell central (Chen, 2003; Meseguer, 1999; Forte, 2004), reforçant la hipòtesi que la deficiència de Se a nivell central podria ser un fet secundari a condicions neurològiques cròniques, on aquest element desenvoluparia un rol fisiopatològic secundari. De la resta de mostres de LCR, 10 van presentar valors augmentats de Se en aquest espècimen. Tal com s'ha descrit a la part de resultats, els valors augmentats de Se es van detectar en condicions clíniques molt diverses entre sí (4 asfíxies perinatales, 3 encefalopaties epilèptiques, 2 desordres mitocondrials i 1 síndrome de Rett). Les possibles implicacions patofisiològiques que aquests valors alts de Se poden tenir no estan clares, tot i que no es poden descartar els efectes tòxics, ja que el SNC és sensible a la intoxicació per Se (Wilber, 1980). A part, estudis en models

animals han associat el Se a un increment de la funció dopaminèrgica fet que està alhora relacionat amb canvis en el comportament i alteracions motores (Ammar, 1981; Watanabe, 1990). D'altra banda no es pot descartar que els valors alterats de Se en LCR també es puguin explicar per una alteració en la permeabilitat de la barrera hematoraquídea tal i com es demostra en els pacients afectats amb la síndrome de Kearns-Sayre (Tondo, 2011) (veure més endavant). Un altre fet que reforçaria la idea d'una alteració a nivell de la barrera és que en el present treball, 4 (3 amb asfíxia) dels 10 pacients amb valors alts de Se en LCR presentaven també valors alts de proteïnes a nivell central.

És important citar uns estudis previs que suggereixen que els valors de Se en el SNC poden estar associats a un increment en el recanvi de dopamina en models animals. El Se podria potenciar la funció de la dopamina gràcies a l'acció que té sobre els receptors D2 (Rasekh, 1997), així com incrementar l'activitat neuronal de les vies dopaminèrgiques (Tsunoda, 2000). En aquest sentit, els resultats obtinguts en la sèrie de pacients KSS donaria suport a la idea de que els valors elevats de Se en LCR tindrien un paper important en la regulació del metabolisme de la dopamina, provocant un augment de la concentració d'HVA en LCR (Tondo, 2011). De totes maneres, els resultats d'aquest treball en concret no donen suport a aquesta hipòtesi ja que quan es va aplicar l'anàlisi múltiple de regressió lineal, es va observar que l'edat actuava com a factor de confusió sobre els valors d'HVA i 5-HIAA cerebrals.

Entre les funcions essencials del Se, la més coneguda és l'antioxidant ja que el Se és cofactor de l'enzim GPx (Chen, 2003; Brenneisen, 2005; Gromer, 2005; Moghadaszadeh, 2006), i com ja s'ha demostrat en treballs anteriors, les deficiències

de Se causen increment de l'estrés oxidatiu (Van Bakel, 2000). La forta associació positiva observada entre el Se i l'activitat de GPx donaria suport al fet de que la determinació de Se és útil com a biomarcador de les defenses antioxidants que depenen de Se.

Estudi de les implicacions de l'excés de seleni en la síndrome de Kearns-Sayre

Els treballs anteriors (l'establiment de valors de referència i l'estudi de l'estat de Se en pacients amb malalties metabòliques de naturalesa diversa) ens va permetre observar que de forma constant i sistemàtica hi havia un grup de pacients que presentava uns valors clarament elevats de Se en LCR. Aquests pacients estaven afectats de la síndrome de Kearns-Sayre. Els efectes directes d'aquest augment de Se al sistema nerviós central són encara desconeguts, tot i que la seva importància i regulació en aquest nivell així com la seva potencial toxicitat estan ben establertes (Wilber, 1980; Richardson, 2005).

Com ja s'ha mencionat anteriorment, el SNC és sensible als efectes tòxics provocats pel Se, i en humans s'ha descrit signes com atàxia, incoordinació motora, hiperreflèxia, depressió, tremolor, irritabilitat i letargia (Wilber, 1980). Alguns d'aquests signes i símptomes es poden observar també en el KSS, especialment aquells més relacionats amb el cerebel (atàxia, falta de coordinació motora i tremolor). Tot això, ens va permetre hipotetitzar en el seu moment que aquests nivells elevats de Se podrien contribuir en part dels mecanismes fisiopatològics típics d'aquesta malaltia. En un treball previ fet en el nostre grup (Serrano, 2010), ja s'havien descrit noves

característiques bioquímiques de la malaltia. S'observava que com més alts els valors de proteïna en LCR, més baixes les concentracions de 5-MTHF, donant suport a la hipòtesi d'un transport defectuós a nivell del plexe coroïdal. La causa d'aquestes alteracions estaria relacionada amb l'acumulació de còpies mutades de DNA mitocondrial en el plexe coroïdal (Tanji, 2000), un dels principals teixits afectats. Aquesta acumulació provocaria una disfunció dels processos de transport dependents d'energia, com per exemple el transport de proteïnes i 5-MTHF. Aquesta disfunció podria explicar també els valors elevats de Se a nivell de LCR. Cal destacar que la concentració de la resta d'elements estudiats en LCR (Cu, Zn, i Mg) va ser normal, reforçant l'idea de que els problemes de transport en aquesta malaltia serien selectius pel Se. De forma permanent, es va observar que els valors d'HVA també estaven elevats (Serrano, 2010). Es podria hipotetitzar que els valors elevats d'HVA en el KSS podrien ser conseqüència de l'alteració de les proteïnes relacionades amb la neurotransmissió. Aquesta alteració estaria causada per un defecte energètic que conduiria a la degradació de dopamina (Serrano, 2010), tot i que una disfunció del transportador OAT-3 no es podria descartar (Spector, 2010). Aquest transportador s'expressa de forma molt important a nivell del plexe, i la seva missió és eliminar l'HVA (metabòlit terminal de la dopamina) des del LCR a la sang. De totes maneres, tant HVA com 5-HIAA s'eliminen del cervell a través de l'OAT-3, per tant si la disfunció està localitzada en aquest transportador, s'esperaria que els 2 paràmetres estiguessin alterats. La nostra hipòtesi era que el Se pogués ser la causa dels valors alts d'HVA observats. Tot i que no s'ha descrit mai en pacients amb desordres neurològics, existeixen treballs on es demostra que el Se pot potenciar la biosíntesi de dopamina i

algunes de les seves funcions relacionades en models animals (Rasekh, 1997; Tsunoda, 2000). Per exemple, el seleni pot potenciar la funció dopaminèrgica per estimulació dels receptors D2 (Rasekh, 1997). De la mateixa manera, la ingesta de Se inorgànic pot provocar un increment en els metabòlits de la dopamina a nivell del cos estriat, suggerint que aquest canvis potenciarien una activitat neuronal incrementada en les vies dopaminèrgiques (Tsunoda, 2000). Tots aquests estudis obrien en el seu moment una porta per relacionar les concentracions d'HVA (com a principal metabòlit de la dopamina) amb l'estat de Se a nivell central. En aquest sentit, els nostres resultats reforçaven l'idea de que nivells alts de Se tinguessin un paper clau en la regulació del metabolisme de la dopamina, i conseqüentment, es poguessin associar a valors elevats d'HVA. Tot i que en el treball anterior no es va poder demostrar una relació estadística entre les concentracions de Se i les d'amines biògenes, no es pot descartar que aquest efecte es localitzi a nivell neuronal i que per tant l'anàlisi bioquímic del LCR no permeti detectar canvis tan subtils però no per això menys importants a nivell neuronal.

L'ús d'aquest nou perfil per a l'avaluació de la disfunció del plexe coroïdal en el KSS pot tenir diferents conseqüències. Durant els darrers 10 anys, en el nostre centre s'ha analitzat més de 1350 mostres de LCR pel diagnòstic i investigació d'encefalopaties pediàtriques d'origen desconegut. Només els 7 pacients amb KSS han mostrat aquest perfil característic. Aquest fet reforça l'idea de que valors baixos de 5-MTHF cerebral i valors elevats d'HVA, de Se i de proteïnes són altament específics pel KSS. Encara no està clar si aquest perfil pot estar alterat en altres malalties que afectin el plexe coroïdal, ja que no hi ha moltes malalties que afectin aquest teixit de forma específica. De totes maneres, s'ha descrit més de 100 transportadors de la barrera

hematoencefàlica i el plexe coroïdal (Spector, 2010) i és possible que altres paràmetres bioquímics estiguin també alterats en aquesta síndrome. Un altre aspecte important de l'estudi d'aquest perfil bioquímic és que pot conduir a un diagnòstic precoç de KSS, fet rellevant ja que és una malaltia molt greu. Aquesta troballa facilitaria la introducció precoç d'un tractament amb suplementes de 5-MTHF així com l'opció d'oferir un control de l'homeòstasi del Se. De fet, el nou pacient que es va identificar arran d'aquest treball presentava una clínica atípica, sense afectació dels principals òrgans que caracteritzen aquesta síndrome. El pacient no presentava retràs psicomotor, afectació cardíaca, oftalmoparèsia ni tampoc afectació de diferents glàndules endocrines, normalment afectades (Serrano, 2010). A diferència dels altres casos, el pacient presentava com a trets clínics principals, estrabisme, tremolor intencional i atàxia troncal.

CONCLUSIONS

1. Per valorar l'estat dels diferents elements traça en estudis nutricionals és necessari establir valors de referència ja que la gran majoria de valors s'han d'estratificar en funció de l'edat. Tant les mostres de plasma com les de sang són vàlides per detectar les deficiències de seleni.

2. Tot i l'aportació adequada de suplementes, els pacients amb ECM i tractament dietètic restringit en proteïnes mostren uns valors de seleni lleugerament disminuïts. Aquests pacients s'haurien de monitoritzar de forma regular. La resta d'elements avaluats en pacients amb ECM van ser semblants als valors de la població control.

3. Les concentracions de Se en LCR estan negativament associades amb l'edat dels pacients i positivament associades amb els valors de proteïna total. Els valors de Se en LCR van mostrar una associació positiva amb l'activitat GPx, suggerint que la quantificació de Se total pot ser un bon reflex de la funció de proteïnes seleno-dependents.

4. Les concentracions de Se en LCR són independents de les concentracions de Se en sang. Es van establir 3 intervals de referència per a la nostra població pediàtrica.

5. En una sèrie gran de pacients pediàtrics amb diferents patologies del SNC es van detectar anormalitats lleus en les concentracions de Se en LCR. Es van observar tant valors baixos de seleni com valors elevats, associats a malalties neuronals d'origen divers. Probablement ambdós estats podrien jugar un paper en la fisiopatologia d'aquestes malalties cròniques.

6. No es va poder demostrar cap associació entre les concentracions de Se i l'estat d'amines biògenes.

7. Tots els pacients KSS tenen valors clarament elevats de Se en LCR i d'altres biomarcadors que configuren un perfil bioquímic del LCR característic d'aquesta síndrome i que va permetre detectar de forma precoç un nou cas de KSS amb trets clínics inespecífics.

8. L'associació entre els valors alts de Se i altres paràmetres bioquímics reforça la idea del plexe coroïdal com a teixit diana en el KSS. La síndrome de Kearns-Sayre podria ser un bon model per a la investigació de la fisiologia i l'estructura anatòmica del plexe coroïdal.

BIBLIOGRAFIA

A

- Allen J, DiMauro S, Coulter D, et al. Kearns-Sayre syndrome with reduced plasma and cerebrospinal fluid folate. *Ann Neurol* 1983; 13, 6: 679-681.
- Acosta PB. Nutrition studies in treated infants and children with phenylketonuria: vitamins, minerals, trace elements. *Eur J Pediatr* 1996; 155:136-139.
- Acosta PB, Yannicelli S. Plasma micronutrient concentrations in infants undergoing therapy for phenylketonuria. *Biol Trace Elem Res* 1999; 67:75-84.
- Agilent Technologies: Wahlen R, Evans L, Turner J, Hearn R. The use of collision/reaction cell ICP-MS for the simultaneous determination of 18 elements in blood and serum samples. 2005. Internet: <http://www.agilent.com/chem>.
- Aguilar MV, Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA et al. Cerebrospinal fluid selenium and chromium levels in patients with Parkinson's disease. *J Neur Transm* 1998; 105:1245-1251.
- Alimonti A, Bocca B, Pino A et al. Elemental profile of cerebrospinal fluid in patients with Parkinson's disease. *J Trace Elem Med Biol* 2007; 21:234-41.
- Ammar EM, Couri D. Acute toxicity of sodium selenite and selenomethionine in mice after icv or iv administration. *Neurotoxicology* 1981; 2:283-286.

- Artuch R, Colomé C, Sierra C, et al. A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 2004; 37: 198-203.

B

- Barretto JR, Silva LR, Leite ME et al. Poor zinc and selenium status in phenylketonuric children and adolescents in Brazil. *Nutr Res* 2008; 28:208-211.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M et al. Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment. *Int J Dev Neurosci* 2007; 25:335-338.
- Belsley DA, Kuh K, Welsch R.E. Identifying influential data and sources of collinearity. In: *Regression diagnostics*. John Wiley & Sons, New York, 1980; ppxv-292.
- Belz S, Frickel C, Wolfrom C et al. High-performance liquid chromatographic determination of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, 5-methyl-tetrahydrofolic acid and folinic acid in serum and cerebrospinal fluid. *J Chromatog B* 1994; 661: 109-118.
- Berr C. Oxidative stress and cognitive impairment in the elderly. *J Nutr Health Aging* 2002; 6(4):261-266.
- Bocca B, Forte G, Petrucci F et al. Development of methods for the quantification of essential and toxic elements in human biomonitoring. *Ann Ist Super Sanità* 2005; 41:165-170.

- Bräuer AU, Savaskan NE. Molecular actions of selenium in the brain: neuroprotective mechanisms of an essential trace element. *Rev Neurosci* 2004; 15(1):19-32.
- Brenneise P, Steinbrenner H, Sies H. Selenium, oxidative stress and health aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 2005; 26:256-67.
- Brenton DP, Pietz J. Adult care in phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia: the relevance of neurological abnormalities. *Eur J Pediatr* 2000; 159: S114-120.
- Burck RF, Hill KE, Motley KM. Selenoprotein metabolism and function: Evidence for more than one function for selenoprotein P *J Nutr* 2003; 133, 1517S-1520S.

C

- Castaño A, Ayala A, Rodríguez-Gomez JA et al. Low selenium diet increases the dopamine turnover in prefrontal cortex of the rat. *Neurochem Int* 1997; 30(6) 549-555.
- Chen J, Berry MJ. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J. Neurochem* 2003; 86:1-12.

D

- Darling G, Mathias P, O'Regan M, et al. Serum selenium levels in individuals on PKU diets. *J Inherit Metab Dis* 1992; 15:769-773.

F

- Fisberg RM, Da Silva-Femandes ME, Fisberg M, et al. Plasma zinc, copper, and erythrocyte superoxide dismutase in children with phenylketonuria. *Nutrition* 15 1999;449-452.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies: Dietary Reference intakes (DRIs): Recommended intakes for individuals. 2004. Internet: <http://www.iom.edu/Object.File/Master/21/372/0.pdf>
- Forte G, Bocca B, Senofonte O et al. Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2004; 111:1031-40.

G

- Gassió R, Artuch R, Vilaseca MA, et al. Cognitive functions and the antioxidant system in phenylketonuric patients. *Neuropsychology* 2008; 22:426-431.
- Gerhardsson L, Lundh T, Minthon L, Londos E. Metal concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2008; 25(6):508-515.
- Gromer S, Eubel JK, Lee BL, Jacob J. Human selenoproteins at a glance. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:2414-2437.
- Gropper SS, Acosta PB, Clarke-Sheehan N, et al. Trace element status of children with PKU and normal children. *J Am Diet Assoc* 1988; 88(4):459-465.

H

- Heitland P, Köster HD. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. *J Trace Elem Med Biol* 2006; 20:253-262.
- Herrero E, Coperías JL, Serrano E. Cobalto. In: Cocho JA, Escanero JF, González de Buitrago JM, eds. *Elementos traza: aspectos bioquímicos, analíticos y clínicos*. Barcelona: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) 1998; 195-206.
- Hsiung CS, Andrade JD, Costa R, et al. Minimizing interferences in the quantitative multielement analysis of trace elements in biological fluids by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Clin Chem* 1997; 43:2303-2311.
- Hyland K, Lauren A, Arnold MS. Value of lumbar puncture in the diagnosis of genetic metabolic encephalopathies. *J Child Neurol* 1998; 14:S9-15.

K

- Kobayashi M, Shimizu S. Cobalt proteins. *Eur J Biochem* 1999; 261:1-9.

L

- Lombeck I, Ebert KH, Kasperek K, et al. Selenium intake of infants and young children, healthy children and dietetically treated patients with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1984; 143:99-102.

M

- Mahalingam TR, Vijayalakshmi S, Prabhu RK et al. Studies on some trace and minor elements in blood. A survey of the Kalpakkam (India) population. Part III: Studies on dietary intake and its correlation to blood levels. *Biol Trace Elem Res* 1997; 57:223-238.
- Meseguer I, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ et al. Cerebrospinal fluid levels of selenium in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1999; 106:309-15.
- Moghadaszadeh B, Beggs AH. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. *Physiology* 2006; 21:307-15.
- Mollah MA, Dey PR, Tarafdar SA et al. Zinc in CSF of patients with febrile convulsion. *Indian J Pediatr* 2002; 69:859-61.

.

O

- Ogihara T, Hirano K, Ogihara H T et al. Non-protein-bound transition metals and hydroxyl radical generation in cerebrospinal fluid of newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatr Res* 2003; 53:594-9.
- Oldfield JE. A brief history of selenium research: From alkali disease to prostate cancer (from poison to prevention). *J Anim Sci* 2002; Online supplement:1-4.
- Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, Fernández-Álvarez E, Campistol J, Artuch R. HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for

the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *J Neurosci Meth* 2005; 142: 153-158.

P

- Pineda M, Ormazábal A, López-Gallardo E, Nascimento A, Solano A, Herrero MD, Vilaseca MA, Briones P, Ibáñez L, Montoya J, Artuch R. Cerebral folate deficiency and leukoencephalopathy caused by mitochondrial DNA deletion. *Ann Neurol* 2006; 59, 394-398.
- Plagia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70:158-169.
- Pyne-Geithman GJ, Caudell DN, Prakash P et al. Glutathione peroxidase and subarachnoid hemorrhage: implications for the role of oxidative stress in cerebral vasospasm. *Neurol Res* 2009; 31:195-199.

R

- Rasekh HR, Davis MD, Cooke LW, et al. The effect of selenium on the central dopaminergic system: A microdialysis study. *Life Sciences* 1997; 61, 1029-1035.
- Richardson R. More roles for selenoprotein P: local selenium storage and recycling protein in the brain. *Biochem J* 2005; 386:e5-e7.

S

- Saudubray JM. The metabolic and molecular bases of inherited disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *Clinical Phenotypes: diagnosis/algorithms*. 7th ed. New York: Mc-Graw-Hill 1995; 327-400.
- Savman K, Nilsson UA, Blennow M et al. Non-protein-bound iron is elevated in cerebrospinal fluid from preterm infants with posthemorrhagic ventricular dilatation. *Pediatr Res* 2001; 49:208-12.
- Serrano M, Garcia-Silva MT, Martin-Hernandez E, et al. Kearns-Sayre syndrome: Cerebral folate deficiency, MRI findings and new cerebrospinal fluid biochemical features. *Mitochon* 2010; 10, 429-432.
- Sierra C, Vilaseca MA, Moyano D, et al. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta* 1998; 276:1-9.
- Spector R. Nature and consequences of mammalian brain and CSF efflux transporters: four decades of progress. *J Neurochem* 2010; 112, 13-23.
- Spector R, Johanson C. Vectorial ligand transport through mammalian choroid plexus. *Pharmaceut Res* 2010; 10, 2054-2062.
- Schweizer U, Streckfuss F, Pelt P, et al. Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not brain selenium supply. *Biochem J* 2005; 386:221-226.

T

- Tanji K, Schon EA, DiMauro S, Bonilla E. Kearns-Sayre syndrome: oncocytic transformation of choroids plexus epithelium. *J Neurol Sci* 2000; 178: 29-36.
- Tondo M, Lambruschini N, Gómez-López L, et al. The monitoring of trace elements in blood samples from patients with inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2010; DOI: 10.1007/s10545-009-9015-8.
- Tondo M, Moreno J, Casado M, et al. Selenium concentration in cerebrospinal fluid samples from a paediatric population. *Neurochem Res* 2010; 35 (8), 1290-1293.
- Tondo M, Málaga I, O'Callahan M et al. Biochemical parameters to assess choroid plexus dysfunction in Kearns-Sayre syndrome patients. *Mitochondrion* 2011; PMID: 21745599.
- Tsunoda M, Johnson VJ, Sharma RP. Increase in dopamine metabolites in murine striatum after oral exposure to inorganic but not organic form of selenium. *Arch Environ Contam Toxicol* 2000; 39, 32-37.

V

- Van Bakel MM, Printzem G, Wermuth B, et al. Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:976-981.
- Van Dael P, Davidson L, Muñoz-Box R, Fay LB, Barclay D. Selenium absorption and retention from a selenite- or selenate- fortified milk-based

formula in men measured by a stable-isotope technique. *British J Nutr* 2001; 85:157-163.

- Velázquez I, Plaud M, Wojna V et al. Antioxidant enzyme dysfunction in monocytes and CSF of Hispanic women with HIV-associated cognitive impairment. *J Neuroimmunol* 2009; 206:106-11.

W

- Wahlen R, Evans L, Turner J, et al. The use of collision/reaction cell ICP-MS for the simultaneous determination of 18 elements in blood and serum samples. 2005; *Agilent Technologies* Internet: <http://www.agilent.com/chem>.
- Watanabe C, Suzuki T, Ohba T, Dejima Y. Transient hypothermia and hyperphagia induced by selenium and tellurium compounds in mice. *Toxicol Lett* 1990; 50:319-326.
- Wilber CG. Toxicology of selenium: A review. *Clin Toxicol* 1980; 17(2), 171-230.
- Wilke BC, Vidailhet M, Favier A, et al. Selenium glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. *Clin Chim Acta* 1992; 207:137-142.
- Wolburg H, Paulus W, 2010. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119, 75-88.

Y

- Yannicelli S, Hambidge KM, Picciano MF. Decreased selenium intake and low plasma selenium concentrations leading to clinical symptoms in a child with propionic acidaemia. *J Inherit Metab Dis* 1992; 15:261-268.

Z

- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988; 38: 1339-1346.

ANNEX

1- Altres publicacions de la doctoranda.

2- Nous estudis derivats.

1- Altres publicacions de la doctoranda

Marques T, Molero M, Tondo M, Hernández M, Vilar P, Cusí V, Torres M, Farré C. *Asociación entre la diabetes mellitus de tipo 1 y la enfermedad celíaca: 6 años de cribado serológico sistemático*. Revista del Laboratorio Clínico, 2009.

Vilaseca MA, Lambruschini N, Gómez-López L, Gutiérrez A, Moreno J, Tondo M, Artuch R, Campistol J. *Long-chain polyunsaturated fatty acid status in phenylketonuric patients treated with tetrahydrobiopterin*. Clinical Biochemistry, 2010.

Dani Velasco-Sánchez, Raquel Montero, Anna Mas, Luis Jiménez, Mireia Tondo, Anna Capdevila, Joan Blanc, Rafael Artuch, Mercè Pineda. *Combined therapy with idebenone and deferiprone in patients with Friedreich ataxia*. Cerebellum, 2010.

Mireia Tondo, Pilar Poo, Montserrat Naudó, Teresa Ferrando, Jordi Genovés, Marta Molero, Loreto Martorell. *Predisposition to epilepsy in fragile X syndrome: Does the Val66Met polymorphism in the BDNF gene play a role?* Epilepsy & Behaviour, 2011.

Mireia Tondo, Josep Gámez, Eduardo Gutiérrez-Rivas, Ramón Medel-Jiménez, Loreto Martorell. *Genotype and phenotype study of 34 Spanish patients diagnosed with oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD)*. Journal of Neurology, 2011.

2- Nous estudis derivats

Arran del treball realitzat aquests últims anys i especialment després del treball realitzat amb els pacients afectats de la síndrome de Kearns-Sayre, els possibles estudis que podrien derivar d'aquesta tesi són:

1. Validar en un model in vitro cel·lular la influència del Se en la funció dopaminèrgica i serotoninèrgica.
2. Aprofundir en l'estudi de la funció dels transportadors localitzats al plexe coroïdal.