



Universidad de Jaén

Departamento de Biología Experimental

TESIS DOCTORAL

•

**PROCESOS BIOLÓGICOS IMPLICADOS EN
FIBROMIALGIA
INFLUENCIA DEL ACEITE DE OLIVA**

Jorge Antolín Ramírez Tejero

Jaén, 2020

PROCESOS BIOLÓGICOS IMPLICADOS EN FIBROMIALGIA. INFLUENCIA DEL ACEITE DE OLIVA

2020



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Biología Experimental

TESIS DOCTORAL

•

**PROCESOS BIOLÓGICOS IMPLICADOS EN
FIBROMIALGIA
INFLUENCIA DEL ACEITE DE OLIVA**

**PRESENTADA POR:
JORGE ANTOLÍN RAMÍREZ TEJERO**

**DIRIGIDA POR:
EVA SILES RIVAS
MARÍA LUISA DEL MORAL LEAL**

JAÉN, ENERO DE 2020



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

D.ª Eva Siles Rivas y D.ª María Luisa del Moral Leal informan, como directoras de la tesis doctoral realizada por D. Jorge Antolín Ramírez Tejero-para optar al Grado de Doctor, que la memoria presentada reúne los requisitos exigidos para su depósito y defensa.

El autor,

Fdo. Jorge Antolín Ramírez Tejero

V.º B.º

Las directoras,

Fdo. D.ª Eva Siles Rivas

Fdo. D.ª María Luisa del Moral Leal

En Jaén, a 20 de enero de 2020

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Después de un lustro, alguna arruga más y muchos padrastros menos, puedo decir que ha quedado escrita mi Tesis Doctoral. Además de poder alcanzar este título, este tiempo me ha servido para crecer profesional y personalmente con la ayuda de las personas que mencionaré en este pequeño texto.

No existen palabras de agradecimiento para devolver a Eva y María Luisa lo que han hecho por mí estos años. Su labor ha ido mucho más allá de la simple dirección académica, siendo ambas las responsables de las aptitudes y conocimientos técnicos que he adquirido y aportándome mucho más si cabe en el plano personal. Cada consejo que me han dado lo guardo con especial cariño, pues me siento muy afortunado de haber podido compartir estos años a su lado. Palabras que no existían en mi diccionario personal, como “calma” o “prudencia”, han tomado sentido gracias a ellas. Espero que recuerden estos años con el mismo cariño y la misma satisfacción que yo lo haré de aquí en adelante.

Para realizar un trabajo de este calibre es necesario el apoyo de una gran estructura de investigación y sus recursos. Por ello, he de agradecer la ayuda del grupo de investigación “Estrés Celular y Edad” y todos sus componentes. Con la estupenda labor de dirección de la Dra. M^a Ángeles Peinado, han sido incontables las ocasiones en las que no hubiera sido posible seguir adelante sin el apoyo de este grupo y, en los tiempos que corren para la investigación, sé que este esfuerzo es de agradecer. Me gustaría resaltar el papel que la Dra. Esther Martínez ha tenido durante este tiempo. Creo que con el trabajo que ha llevado a cabo a mi lado en estos 5 años podría inaugurarse la figura académica de “Directora en la sombra”.

Entre los recursos que han hecho posible la finalización de esta tesis es necesario mencionar los más importantes: las personas. El entorno de trabajo que he vivido durante este tiempo en el laboratorio es difícilmente mejorable, especialmente en el último año. Aquel programa de Garantía Juvenil que me dio empleo durante 1 año me proporcionó algo más que dinero: un grupo de compañeros que pasaron a ser amistades para el resto de mi vida. El apoyo tan grande que supuso su aparición fue vital para poder sobrellevar un año muy cargado en todos los ámbitos.

Posiblemente, los que más sufren el estrés emocional que supone llevar a cabo una tesis doctoral es el entorno más cercano al doctorando. Por este motivo, tengo que agradecer

la paciencia de mis padres, mi hermana y mi abuelo, afectados colaterales de un proceso tan largo y absorbente como parece. Sin duda, la persona que mejor conoce y más cerca ha vivido este hecho es Montse. El apoyo de todos ellos fue el punto de partida que me hizo comenzar a andar por este camino que tanto tiempo juntos nos ha robado. Seguro que algún día tendrá sus frutos.

Por último, me gustaría agradecer el apoyo incondicional de la Asociación de Fibromialgia de Jaén (Afixa). Espero que algún día la ciencia pueda devolverles una décima parte de lo que estos pacientes hacen por ella.

<<Quien prefiera una “vida académica” como una manera de retirarse de la realidad, no debe optar por la biología. Este campo es para un hombre o una mujer que desee acercarse aún más a la vida>>

Muller, H. J. (1953). The Call of Biology. *AIBS Bulletin*, 3(5), 4

ÍNDICE	
RESUMEN	7
ABREVIATURAS.....	11
I. INTRODUCCIÓN	17
I.1 Fibromialgia	17
I.1.1 Generalidades.....	17
I.1.2 Etiología	18
I.1.3 Diagnóstico	22
I.1.4 Tratamiento.....	24
I.2 El Aceite de Oliva	26
I.2.1 Tipos	26
I.2.2 Composición	27
I.2.3 Propiedades saludables del aceite de oliva	29
I.2.4 El hidroxitirosol: un compuesto bioactivo del aceite de oliva virgen extra	32
I.2.4.1 Generalidades	32
I.2.4.2 Biodisponibilidad.....	33
I.2.4.3 Propiedades beneficiosas	34
I.3 Proteómica: una herramienta con aplicaciones clínicas	36
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
II.1 Hipótesis	45
II.2 Objetivos	45
III. MATERIAL Y MÉTODOS	49
III.1 Modelo <i>in vivo</i> : estudio en plasma	49
III.1.1 Mujeres participantes en el estudio. Criterios de inclusión y exclusión	49
III.1.2 Consumo de una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra en pacientes de fibromialgia	50

III.1.3 Obtención y procesamiento de muestras.....	50
III.1.4 Estudio del perfil proteómico.....	51
III.1.4.1 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS)	51
III.1.4.2 Análisis de expresión diferencial	52
III.1.4.3 Análisis bioinformático de las proteínas diferencialmente expresadas	53
III.1.5 Validación de las proteínas diferencialmente expresadas en cada grupo experimental	54
III.2 Modelo <i>in vitro</i> : estudio en fibroblastos dermales.....	54
III.2.1 Tratamiento con hidroxitirosol	54
III.2.2 Descripción y mantenimiento de los cultivos primarios.....	54
III.2.3 Valoración de la citotoxicidad del hidroxitirosol.....	55
III.2.4 Determinación del nivel de estrés oxidativo.....	55
III.2.5 Estudio del perfil proteómico y análisis bioinformático	56
III.2.6 Validación de las proteínas diferencialmente expresadas en cada grupo experimental.....	56
III.3 Análisis estadístico	57
IV. RESULTADOS	61
IV.1 Diferencias en el proteoma plasmático de pacientes de fibromialgia y efecto del consumo de aceite de oliva virgen extra	61
IV.1.1 Diferencias asociadas a la fibromialgia en el proteoma plasmático	61
IV.1.1.1 Datos clínicos y demográficos de las participantes en el estudio....	61
IV.1.1.2 Análisis comparado del perfil proteómico del plasma.....	61
IV.1.1.3 Análisis bioinformático de las proteínas diferencialmente expresadas	63
IV.1.1.3.1 Análisis IPA	64

IV.1.1.3.2 Análisis KEGG	67
IV.1.1.4 Validaciones de los resultados de proteómica	68
IV.1.1.5 Utilidad diagnóstica de las proteínas diferencialmente expresadas.....	69
IV.1.2 Efecto del consumo de una dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra en el proteoma plasmático de pacientes de fibromialgia	70
IV.1.2.1 Datos clínicos y demográficos de las participantes en el estudio.....	70
IV.1.2.2 Análisis comparado del perfil proteómico del plasma	71
IV.1.2.3 Análisis bioinformático de las proteínas diferencialmente expresadas.....	73
IV.1.2.3.1 Análisis IPA.....	73
IV.1.2.3.2 Análisis KEGG	76
IV.1.2.4 Proteínas normalizadas por el consumo de aceite de oliva virgen extra.....	77
IV.1.2.5 Validaciones de los resultados de proteómica	77
IV.2 Diferencias asociadas a la fibromialgia en el proteoma de fibroblastos dermales y efecto del hidroxitirosol	79
IV.2.1 Diferencias asociadas a la fibromialgia en el proteoma de fibroblastos dermales.....	79
IV.2.1.1 Nivel de estrés oxidativo.....	79
IV.2.1.2 Análisis comparado del proteoma de fibroblastos.....	79
IV.2.1.3 Análisis bioinformático de las proteínas diferencialmente expresadas.....	82
IV.2.1.3.1 Análisis IPA.....	82
IV.2.1.3.2 Análisis KEGG	88
IV.2.1.4 Validaciones de los resultados de proteómica	89

IV.2.2 Efecto del hidroxitirosol en el proteoma de fibroblastos dermales	90
IV.2.2.1 Efecto citotóxico del hidroxitirosol	90
IV.2.2.2 Efecto del hidroxitirosol sobre el nivel de estrés oxidativo	91
IV.2.2.3 Análisis comparado del efecto del hidroxitirosol sobre el proteoma de fibroblastos dermales	92
IV.2.2.4 Análisis bioinformático de las proteínas normalizadas por el hidroxitirosol	94
IV.2.2.4.1 Análisis IPA	94
IV.2.2.4.2 Análisis KEGG	96
IV.2.2.5 Validaciones de las proteínas reguladas por el hidroxitirosol	100
V. DISCUSIÓN	103
V.1 Diferencias asociadas a la fibromialgia en el proteoma plasmático de pacientes y efecto del consumo de aceite de oliva virgen extra	103
V.1.1 Diferencias asociadas a la fibromialgia en el proteoma plasmático.....	103
V.1.2 Efecto del consumo de una dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra en el proteoma plasmático de pacientes de fibromialgia	108
V.2 Diferencias asociadas a la fibromialgia en el proteoma celular de fibroblastos dermales y efecto del tratamiento con hidroxitirosol	114
V.2.1 Diferencias asociadas a la fibromialgia en el proteoma celular de fibroblastos dermales.....	114
V.2.2 Efecto del tratamiento con hidroxitirosol sobre el proteoma celular de fibroblastos dermales	119
VI. CONCLUSIONES	127
VII. ANEXOS.....	131
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	145
PUBLICACIÓN	145

RESUMEN

RESUMEN

La fibromialgia (FM) es una forma de reumatismo no articular de etiología desconocida, aunque se la ha relacionado con un incremento del nivel de estrés oxidativo y alteraciones inflamatorias. Este hecho dificulta su diagnóstico y tratamiento, haciendo imprescindible una investigación multidisciplinar en este campo. La proteómica permite el análisis sistemático y con gran sensibilidad de las proteínas que se expresan en muestras complejas. Por tanto, se está convirtiendo en una técnica clave en clínica como herramienta de aproximación diagnóstica. El aceite de oliva virgen extra (AOVE) y el hidroxitirosol (HT), uno de sus fenoles más estudiados, poseen numerosas propiedades beneficiosas entre las que destacan su capacidad antioxidante y antiinflamatoria. En esta tesis, mediante proteómica, se caracterizan los cambios moleculares asociados a la FM en plasma y en fibroblastos dermales, así como el efecto que sobre los mismos ejercen el AOVE y el HT, respectivamente. Los resultados indican que en el plasma de las pacientes de FM se altera la expresión de 33 proteínas y se modifican 25 rutas moleculares, siendo las de mayor significación estadística: (i) la señalización de respuesta de fase aguda, (ii) el sistema del complemento, (iii) el sistema de la coagulación, (iv) la activación del receptor hepático X (LXR)/receptor retinoide X (RXR) y (v) la activación del receptor farnesoide X (FXR)/receptor retinoide X (RXR). El consumo de AOVE logró normalizar los niveles de expresión de 7 proteínas (ACTB, APOC2, APOL1, CBG, FIBG, SAA4, THBG) relevantes en estas rutas. Por otra parte, el análisis en fibroblastos dermales detectó la alteración en FM de 357 proteínas implicadas en múltiples procesos biológicos, la mayoría de ellos encuadrados en la homeostasis de la matriz extracelular y el metabolismo oxidativo, ambos estrechamente relacionados con la inflamación. El tratamiento con HT revirtió la expresión de 91 proteínas implicadas en estos procesos. En definitiva, el análisis proteómico confirma la implicación en FM de procesos biológicos relacionados con la inflamación y el metabolismo lipídico, así como la acción normalizadora que sobre estos ejercen el AOVE y el HT.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AAPT	Iniciativa ACTION-APS para la taxonomía del dolor
ACR	Colegio Americano de Reumatología
ACTION	Asociación público-privada para la Transmisión, la Innovación, las Oportunidades y las Redes de Ensayos Clínicos de Analgésicos, Anestésicos y Adicciones
AOR	Aceite de Oliva Refinado
AOV	Aceite de Oliva Virgen
AOVE	Aceite de Oliva Virgen Extra
APS	Sociedad Americana del Dolor
AUC	Área bajo la curva
CAT	Catalasa
COI	Consejo Oleícola Internacional
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DM	Dieta Mediterránea
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESI	Electro spray ionizante
EULAR	Liga Europea Contra el Reumatismo
EVA	Escala Visual Analógica
FDA	Administración Americana de Alimentos y Medicamentos
FDR	Tasa de descubrimientos falsos

FIQ	Cuestionario de Impacto de la Fibromialgia
FIRST	<i>Fibromialgia Rapid Screening Tool</i>
FM	Fibromialgia
FXR	Receptor farnesoide X
GO	<i>Gene Ontology</i>
GP6	Glicoproteína VI
GSH	Glutati3n reducido
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HHA	Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal
HT	Hidroxitirosol
IL	Interleuquina
ILK	Quinasa ligada a integrina
IMC	Índice de masa corporal
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LC	Cromatografía líquida
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
LXR	Receptor hepático X
MCS-12	Componente psicol3gico del cuestionario de salud SF-12
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasa de la matriz
MS	Espectrometría de masas
NO	Óxido nítrico
PANTHER	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i>

PCR	Proteína C reactiva
PCS-12	Componente físico del cuestionario de salud SF-12
PPARGC1A	coactivador 1 α del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PGC-1 α)
PREDIMED	Estudio para la Prevención con Dieta Mediterránea
RE	Retículo endoplasmático
ROC	Curva característica operativa del receptor
RXR	Receptor retinoide X
SD	Desviación estándar
SF-12	Cuestionario de salud SF-12
TAG	Triacilglicéridos
TNF	Factor de necrosis tumoral
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VSG	Velocidad de sedimentación globular

I.INTRODUCCIÓN

I.1 FIBROMIALGIA

I.1.1 Generalidades

La fibromialgia (FM) es una enfermedad crónica y compleja, de etiología aún desconocida que cursa con dolor músculo-esquelético generalizado (Krsnich-Shriwise, 1997). Este dolor suele ir acompañado de una fuerte rigidez articular y una alta sensibilidad en músculos y tendones que provocan un mal descanso nocturno y un estado de fatiga generalizada (Jahan et al., 2012; Prados y Miró, 2012; fig. 1).

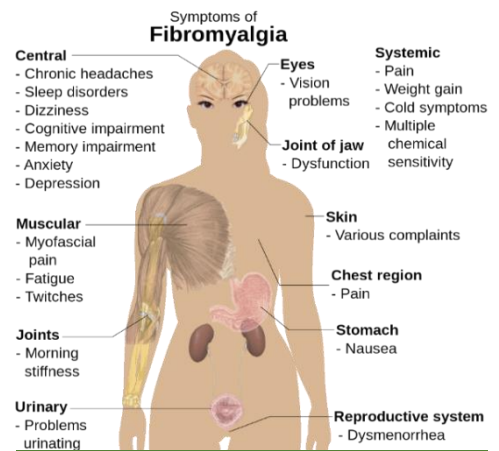


Figura 1. Síntomas asociados a FM (Häggström, 2014).

La trascendencia de esta enfermedad ha aumentado considerablemente en los últimos años hasta el punto de llegar a convertirse en un problema sanitario de primer nivel. En este sentido, los estudios más recientes sitúan su prevalencia entre un 0,2 y un 6,6 % de la población mundial (Marques et al., 2017; fig. 2), siendo la mayor parte de los afectados (hasta un 89 %) mujeres (Sumpton y Moulin, 2014). En España el porcentaje de personas que sufren FM supera el 2 %, con el doble de casos de mujeres por cada hombre diagnosticado, siendo más frecuente entre los 46 y los 60 años (Mas et al., 2008); aunque este dato puede variar en función del criterio diagnóstico utilizado (Jones et al., 2015).

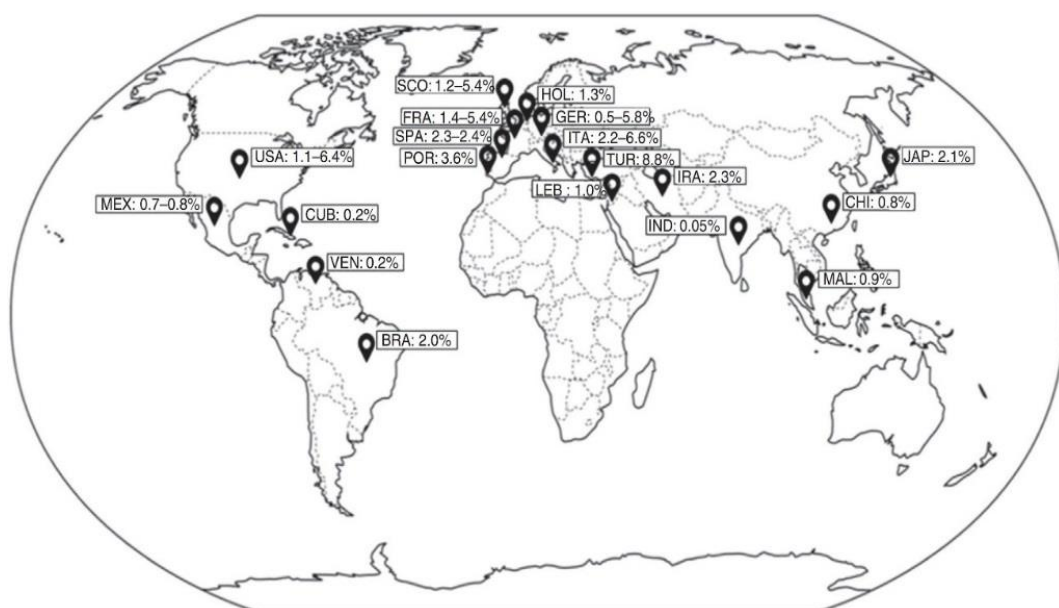


Figura 2. Prevalencia mundial de la FM. Datos recopilados de diversos estudios de investigación publicados entre 2004 y 2014 (Marques et al., 2017).

La Organización Mundial de la Salud, en la última edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades, encuadra la FM dentro del grupo de patologías de Dolor Primario Crónico (código MG30.0) junto al Síndrome del Dolor Crónico Difuso (World Health Organization, 2018). Sin embargo, la poca especificidad de los síntomas asociados a ella dificulta el establecimiento de un diagnóstico diferencial (Häuser et al., 2017). Esto supone un grave problema, puesto que es frecuente la asociación de la FM con patologías de origen muy diverso como el síndrome del intestino irritable (Hausteiner-Wiehle y Henningsen, 2014), alteraciones de tipo reumático como la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico (Haliloglu et al., 2014) y patologías de carácter psicológico como la depresión, el estrés o la ansiedad (Alok et al., 2011).

I.1.2 Etiología

Pese a los numerosos estudios que se iniciaron en los años noventa y que aún continúan, la FM sigue siendo un complejo rompecabezas de etiopatogenia desconocida. Así, en los últimos años se han valorado múltiples factores que podrían estar implicados en su aparición y desarrollo. Entre estos factores destacan la predisposición genética (Park et al., 2015), problemas a nivel de sensibilidad central (Ablin et al., 2008), trastornos inflamatorios y oxidativos (Atzeni et al., 2019; Coskun Benlidayi, 2019) e incluso desajustes hormonales (Bramwell, 2010).

Respecto a la susceptibilidad genética, se ha encontrado relación entre diferentes polimorfismos y el mal funcionamiento de los sistemas serotoninérgico y catecolaminérgico. Este hecho podría explicar las alteraciones en la percepción del dolor, la falta de control anímico o la dificultad en la gestión del descanso, características típicas de la FM. Así, en dos estudios independientes con distintas cohortes de pacientes se detectó la misma versión corta del promotor del transportador de la serotonina. Esta mutación, causada por una delección de 44 pares de bases del brazo largo del cromosoma 17 (17q11.2), está posiblemente asociada al desarrollo de la patología (Offenbaecher et al., 1999; Cohen et al., 2002), pues conlleva la disminución de la expresión del transportador de la serotonina dificultando la entrada a las células de este neurotransmisor. Además, esta misma mutación se relaciona con la aparición de alteraciones psicológicas relacionadas con la ansiedad (Lesch et al., 1996). Del mismo modo, haplotipos determinados de los polimorfismos rs6269, rs4633, rs4818 y rs4680 del gen

de la catecol O-metiltransferasa provocan una menor expresión de esta enzima implicada en la degradación de las catecolaminas y un umbral menor de sensibilidad térmica y del dolor en las pacientes de FM (Martínez-Jauand et al., 2013). En una cohorte más amplia de pacientes españolas, Estévez-López y colaboradores (2018) han vinculado la existencia de dos polimorfismos (el rs841, en el gen de la guanosina trifosfato ciclohidrolasa y el rs2097903, en el gen de la catecol O-metiltransferasa) con una mayor susceptibilidad a padecer esta enfermedad subrayando, de nuevo, la posible implicación del sistema catecolaminérgico en la patología. En esta línea, también se ha encontrado relación entre la FM y un polimorfismo del gen que codifica al receptor D4 de la dopamina. Concretamente, se observaron diferencias en el número de repeticiones del exón III que se asociaban a puntuaciones distintas en los test psicológicos y de personalidad de las pacientes (Buskila et al., 2004). En este sentido, nuestro grupo ha encontrado desajustes en los niveles de dopamina y norepinefrina en enfermas de FM (Rus et al., 2018), resultado que refuerza el vínculo entre la alteración de ciertos neurotransmisores y la patología. Pero la genética también parece afectar a otros niveles en la FM. Así, el estudio llevado a cabo por Lukkahatai y colaboradores (2018), basado en la aplicación de un algoritmo predictivo sobre datos transcriptómicos de sangre total de pacientes de FM, ha descubierto un total de 57 genes cuya expresión podría ser discriminatoria entre personas sanas y pacientes de FM. Estos genes estaban asociados con la señalización por glutamato, la fosforilación oxidativa y la función mitocondrial. De hecho, en el genoma de la mitocondria se han localizado diferencias genéticas asociadas a la FM. Concretamente, en un modelo *in vitro* de fibroblastos de una paciente se observó una mutación puntual en el gen mitocondrial del *citocromo b* (mtCYB, m.5804T>C; Cordero et al., 2016). Esta mutación se asoció con un aumento del estrés oxidativo y de la expresión del inflammasoma NLRP3, complejo proteico encargado del reconocimiento de patrones moleculares desencadenantes de procesos tan importantes como la apoptosis o la respuesta inflamatoria inmune innata (Shao et al., 2015).

Existe un buen número de investigaciones que relacionan a la FM con un estado proinflamatorio. La respuesta inflamatoria se caracteriza, entre otros, por vasodilatación en la zona, aumento en la permeabilidad capilar y migración de granulocitos y monocitos a los tejidos (Guyton et al., 1971). En este sentido, se ha estudiado la relación entre la proporción de las distintas subpoblaciones de monocitos circulantes y síntomas de la FM como la

intensidad del dolor o el estrés. Taylor y colaboradores (2016) observaron una correlación inversa entre los niveles de monocitos clásicos (CD14⁺/CD16⁻) e intermedios (CD14⁺/CD16⁺) y la intensidad del dolor en las pacientes, circunstancia que podría ocurrir como consecuencia de la migración de estas células a los tejidos. No obstante, el origen de estos trastornos inflamatorios que subyacen en la FM sigue sin esclarecerse en la actualidad. Se ha sugerido que la inflamación que tiene lugar en los tejidos periféricos, el cerebro y la columna vertebral en las pacientes de FM podría tener un origen neurológico (Littlejohn y Guymmer, 2018). En este sentido, un reciente metaanálisis indica la elevada prevalencia de la neuropatía de fibras pequeñas (hasta un 49 %) en las pacientes de FM (Grayston et al., 2019). La inflamación también se ha asociado a otras causas, como a la existencia de disfunciones mitocondriales, ya citadas, que se relacionan con una mayor concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células mononucleares de la sangre procedente de pacientes (Cordero et al., 2013b). Particularmente, se ha establecido una estrecha relación entre el estrés causado por las ERO y las especies reactivas de nitrógeno (ERN), la disfunción mitocondrial y uno de los síntomas más característicos de la FM: la alteración en la percepción del dolor debida al aumento de la sensibilidad central (Meeus et al., 2013; fig. 3). Este síntoma también se ha relacionado con niveles mayores de la sustancia P en el líquido cefalorraquídeo (Russell et al., 1994; Liu et al., 1995; Bradley et al., 1996). A los estudios mencionados con anterioridad, hay que añadir otros como el de Altindag y Celik (2006), en el que se demostró que la capacidad antioxidante total de las pacientes de FM estaba inversamente correlacionada con la intensidad del dolor que estas percibían, medida en términos de puntuación en la escala visual analógica (EVA). También se ha comprobado que estas pacientes podrían tener en suero niveles menores de glutatión reducido (GSH) y catalasa (CAT), dos potentes antioxidantes (Sendur et al., 2009). En línea con esta hipótesis, el trabajo de Sánchez-Domínguez y colaboradores (2015) confirmó la coexistencia de niveles elevados de estrés oxidativo y una

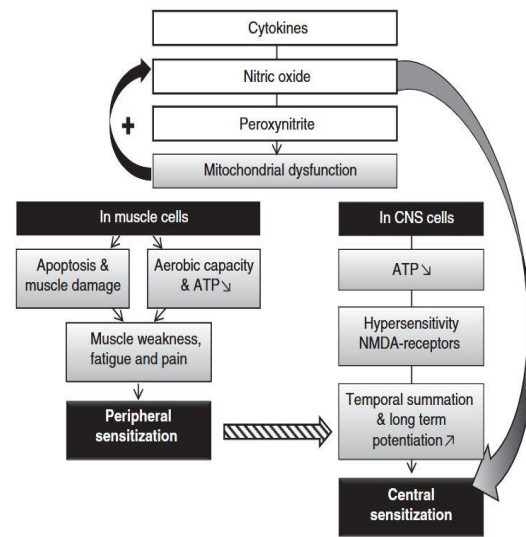


Figura 3. Modelo propuesto por Meeus y colaboradores (2013) para explicar la relación entre el estrés oxidativo y nitrosativo, la disfunción mitocondrial, la percepción del dolor y la sensibilización periférica y central.

Figura 3. Modelo propuesto por Meeus y colaboradores (2013) para explicar la relación entre el estrés oxidativo y nitrosativo, la disfunción mitocondrial, la percepción del dolor y la sensibilización periférica y central.

importante disfunción mitocondrial en biopsias de piel de enfermas de FM. Nuestro grupo también encontró un incremento en el nivel de peroxidación lipídica y del daño oxidativo en el ADN (La Rubia et al., 2013) asociada con un aumento en los niveles de proteína C reactiva (PCR; Rus et al., 2016a).

Las alteraciones músculo-esqueléticas y de fatiga crónica que sufren las pacientes de FM también se han relacionado con desajustes hormonales a nivel del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA; Harbeck et al., 2013). Este vínculo se ha estudiado durante décadas (Demitrack y Crofford, 1998), comprobándose que en estas pacientes existe una alteración en la secreción circadiana de la hormona cortisol (Fatima et al., 2013). Esta hormona esteroidea es producida en la glándula suprarrenal y cuenta con multitud de funciones homeostáticas como el control del metabolismo glucídico (Christiansen et al., 2007), la gestión de la respuesta inflamatoria (Nijm y Jonasson, 2009) o la regulación de la presión sanguínea (Nystrom et al., 1998). Además, Barceló-Martínez y colaboradores (2018) han comprobado que los niveles de cortisol en el suero de las pacientes están fuertemente influenciados por factores neurofisiológicos como la flexibilidad cognitiva o la memoria. De hecho, el cortisol se eleva en pacientes de FM sometidos a estrés psicosocial en comparación con personas sanas (Coppens et al., 2018), apuntando también a la relación entre la patología y una alteración del eje HHA. Igualmente, se ha sugerido que la FM podría estar asociada a alteraciones en los niveles de la hormona del crecimiento, secretada por la adenohipófisis, que presenta niveles bajos en enfermas de FM severa (Cuatrecasas et al., 2010). Este hecho ha sido confirmado recientemente en otra cohorte de 60 pacientes de FM que, además de presentar niveles significativamente menores que las personas sanas de la hormona del crecimiento, mostraron niveles menores del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 y niveles mayores de leptina. Estos resultados vinculan la patología con posibles alteraciones del eje HHA y del metabolismo energético (Koca et al., 2018). De hecho, ya se llevó a cabo un ensayo clínico de administración de hormona del crecimiento en bajas dosis como coadyuvante en pacientes de FM severa que también presentaban niveles reducidos del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1. Como resultado, este tratamiento redujo el dolor a largo plazo (Cuatrecasas et al., 2012; www.clinicaltrials.gov/, [NCT00933686](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00933686)).

I.1.3 Diagnóstico

La falta de consenso sobre la etiopatogenia de la FM hace que su diagnóstico siga estando apoyado únicamente en datos clínicos. El criterio tradicionalmente utilizado es el del Colegio Americano de Reumatología (ACR; Wolfe et al., 1990). Este criterio está basado en la detección del umbral de dolor en los puntos gatillo sobre los que se realiza una presión de 2 a 4 kg/cm² (fig. 4). Para un diagnóstico positivo, el dolor ha de manifestarse en, al menos, 11 de estos 18 puntos que se reparten por el cuerpo de la siguiente forma:

- i. Occipucio: bilateral, en las inserciones del músculo occipital.
- ii. Cervicales bajas: bilateral, en los aspectos anteriores de los espacios intertransversales de las vértebras C5 y C6.
- iii. Trapezio: bilateral, en el punto intermedio del borde superior del músculo.
- iv. Supraespinoso: bilateral sobre la espina escapular junto al borde medial.
- v. Segunda costilla: bilateral, en la segunda unión costocondral.
- vi. Epicóndilo lateral: bilateral, a 2 cm de los epicóndilos.
- vii. Glúteo: bilateral, en los cuadrantes superiores externos de las nalgas, en el pliegue anterior del músculo.
- viii. Trocánter mayor: bilateral, posterior a la prominencia troncantérica.
- ix. Rodilla: bilateral, en la almohadilla medial proximal a la línea de la articulación.

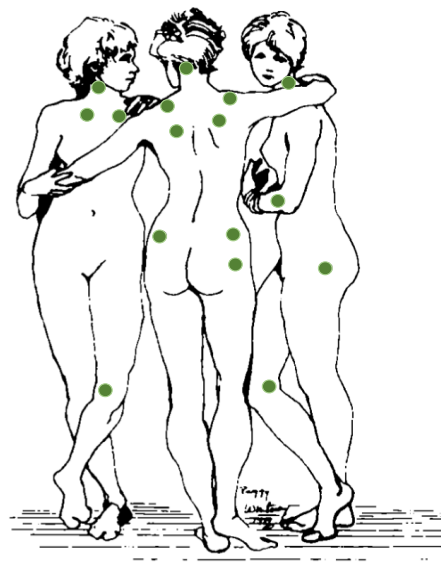


Figura 4. Localización de los puntos gatillo (Wolfe et al., 1990).

No obstante, en 2010 el ACR modificó los criterios (Wolfe et al., 2011) y se comenzaron a considerar una serie de síntomas que hasta ese momento no habían sido valorados. Concretamente, se eliminó la palpación de los puntos gatillo y se introdujeron los conceptos de índice de dolor generalizado y la puntuación de la severidad de los síntomas. De esta forma, el diagnóstico pasó a basarse en una encuesta clínica que tiene en consideración factores como el sueño no reparador, fatiga, síntomas cognitivos y somáticos asociados, así como la percepción del dolor por parte del propio paciente. En esta línea, se han llegado a desarrollar

herramientas diagnósticas complementarias a los criterios del ACR, basadas en cuestionarios que incluyen todos los puntos citados anteriormente (Baron et al., 2014). Uno de los más extendidos es el cuestionario FiRST (*Fibromyalgia Rapid Screening Tool*; Perrot, Bouhassira et al., 2010), validado en distintas cohortes de pacientes (Torres et al., 2013, Collado et al., 2016). Asimismo, se ha evaluado la capacidad diagnóstica de diferentes test de valoración del dolor (de la Coba et al., 2018). No obstante, el mayor avance en el diagnóstico de esta enfermedad se ha publicado en el trabajo de Arnold y colaboradores (2018), en el que se establecen las pautas para el diagnóstico diferencial de las distintas patologías relacionadas con el dolor. Este trabajo ha sido promovido y desarrollado por la Asociación público-privada para la Transmisión, la Innovación, las Oportunidades y las Redes de Ensayos Clínicos de Analgésicos, Anestésicos y Adicciones (ACTTION). Esta asociación, en colaboración con la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Sociedad del Dolor (APS) americanas, puso en marcha la iniciativa ACTTION-APS para la Taxonomía del Dolor (AAPT), que contaba entre sus componentes con un importante número de expertos en FM. Así, en el nuevo criterio diagnóstico se implican las 5 dimensiones que la AAPT distingue para abordar el diagnóstico de este tipo de enfermedades:

- i. Dimensión 1: criterios diferenciales de diagnóstico. En esta dimensión, el paciente deberá mostrar dolor en, al menos, 6 de las 9 zonas establecidas: cabeza, brazos, pecho, abdomen, zona superior e inferior de la espalda y piernas. Este dolor deberá haber sido persistente durante un mínimo de 3 meses e ir acompañado de alteraciones del sueño moderadas/severas o fatiga.
- ii. Dimensión 2: características comunes a otras patologías que pueden ayudar a diagnosticar la FM como la rigidez muscular, la sensibilidad central o los problemas cognitivos (falta de concentración, problemas con la memoria, etc.).
- iii. Dimensión 3: comorbilidades médicas y psiquiátricas comunes como las migrañas, el síndrome del intestino irritable, la artritis reumatoide, el estrés y la ansiedad, entre otras muchas.
- iv. Dimensión 4: consecuencias neurobiológicas, psicosociales y funcionales. Esta dimensión incluye aquellas consecuencias a largo plazo de padecer la enfermedad.
- v. Dimensión 5: posibles mecanismos neurobiológicos, psicosociales, factores de riesgo y factores preventivos implicados en la patología.

Aunque el diagnóstico que la AAPT propone es el más completo hasta la fecha, aún no se ha encontrado un análisis clínico o de imagen certero que pueda basarse en biomarcadores vinculados a esta patología. Esta línea de investigación está siendo abordada en la actualidad por algunas empresas del sector biotecnológico que incluso han llegado a comercializar test diagnósticos basados en los niveles de interleuquinas (IL) en sangre (Wallace et al., 2015), o en marcadores del metabolismo energético, endocrinos e inmunológicos de los pacientes (Pronacera Therapeutics S.L., 2019). Sin embargo, la incertidumbre y la falta de confianza que aún suscita el diagnóstico de la FM (Hadker et al., 2011) hace que el diagnóstico de estos pacientes pueda llegar a demorarse hasta 5 años.

En definitiva, la FM es una entidad clínica de difícil abordaje diagnóstico, que afecta considerablemente a las esferas biológica, psicológica y social de las personas que la padecen, llegando incluso a convertirse en una condición invalidante que supone un elevado coste socio-sanitario y asistencial (Sicras-Mainar et al., 2009).

I.1.4 Tratamiento

La falta de consenso sobre la etiopatogenia de la FM y su complicado diagnóstico han contribuido a que, hasta la fecha, no se cuente con un tratamiento eficaz para la misma. Recientemente, se ha propuesto el empleo de terapias adaptadas a cada paciente en particular (medicina personalizada) que priorizan aliviar la intensidad de los diferentes síntomas desde un punto de vista multidisciplinar, combinando el tratamiento farmacológico con el no farmacológico (Stournaras y Petrovic, 2019). Esta circunstancia, unida al carácter paliativo de las terapias existentes, hace que el conocimiento que el propio paciente adquiera de su enfermedad sea un punto crucial en el manejo de la misma.

El tratamiento farmacológico clásico de la FM se centraba en dos de sus síntomas más característicos: la depresión y el dolor. En este contexto, se ha probado el tratamiento con antidepresivos, antiinflamatorios no esteroideos u otros analgésicos (Solitar, 2010). Por ejemplo, en diversos estudios se evaluó el tratamiento con opioides como el tramadol aunque, al igual que con el resto de fármacos prescritos, los resultados son poco concluyentes (Traynor et al., 2011). En los últimos años, se está utilizando la mirtazapina que alivia el dolor y mejora el descanso nocturno y la calidad de vida de las pacientes (Ottman et al., 2018). Además, se

está realizando un ensayo clínico con un compuesto que mimetiza la acción neurotransmisora del glutamato (www.clinicaltrials.gov/, NCT03249103), con el objeto de aprovechar su efecto sobre la plasticidad neuronal, el control del aprendizaje, la memoria y la analgesia. No obstante, hasta la fecha, los únicos fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la FM son los antidepresivos duloxetina y milnacipran (inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina) y el anticonvulsivo pregabalina, aunque la mayor parte de los pacientes no experimentan mejora alguna en cuanto a la percepción del dolor (Häuser y Fitzcharles, 2018). Por su parte, la Agencia Europea de Medicamentos continúa sin aceptar ningún fármaco como tratamiento de elección para esta patología (Stournaras y Petrovic, 2019). En general, se ha comprobado que se obtienen mejores resultados cuando el uso de fármacos se acompaña de otras medidas, lo que ha llevado a la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) a aconsejar que se prioricen las medidas no farmacológicas (Macfarlane et al., 2017; Atzeni et al., 2019). Entre estas medidas se encuentra la intervención psicológica desde una aproximación cognitiva-conductual, dirigida a la mejora de los síntomas asociados al estrés, la ansiedad y la depresión (Lami et al., 2013). Este tipo de aproximación se utilizó en un grupo de 48 pacientes de FM, observándose una mejoría no sólo en las complicaciones asociadas a la ansiedad o al estrés, sino también en la respuesta al dolor crónico (Karlsson et al., 2015). La aproximación cognitivo-conductual, aplicada durante 2 semanas para paliar el insomnio, revirtió la atrofia de la materia gris que aparece en pacientes de FM (McCrae et al., 2018). En un ensayo clínico piloto muy reciente en el que también se ha utilizado esta estrategia, se ha logrado incluso reducir los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 en sangre (Zabihyeganeh et al., 2019). La FM también se trata desde un punto de vista higiénico-dietético, con la realización de ejercicio físico de intensidad baja a moderada. Esta actividad es frecuentemente recomendada a los pacientes y con ella se ha logrado mejorar parámetros como la fortaleza muscular, la intensidad del dolor y el estado general de salud (Larsson et al., 2015). Otros autores han propuesto la combinación de ambas aproximaciones como tratamiento de mayor eficacia (Collado et al., 2001). A nivel nutricional se han propuesto distintas intervenciones. Es habitual que los pacientes con FM presenten déficits de micronutrientes como el selenio, el magnesio o el zinc, vitaminas B y D e incluso ciertas proteínas, por tanto, la ingesta de carnitina, aminoácidos aromáticos o nutrientes antioxidantes puede ser de gran ayuda en la patología (Bjorklund et al., 2018). Con la intención de equilibrar el estado oxidativo de las pacientes de FM, algunos grupos han probado la

suplementación con Coenzima Q 10, un potente antioxidante con el que se han obtenido buenos resultados (Cordero et al., 2013a; Cordero et al., 2014b; Di Pierro et al., 2017). También se ha puesto en práctica la aplicación de una dieta baja en carbohidratos de cadena corta y alcoholes fermentables. Este tipo de dieta consiguió mejorar la calidad de vida de los pacientes y reducir su dolor (Marum et al., 2016). En esta línea, nuestro grupo observó una mejoría en el estado oxidativo y en la percepción sobre su estado de salud de las mujeres afectadas de FM que participaron en una intervención nutricional con aceite de oliva virgen extra (AOVE; Rus et al., 2016b). Este aceite vegetal, principal fuente grasa de la Dieta Mediterránea (DM), es un aceite rico en compuestos antioxidantes que se utiliza en todo el mundo debido a sus numerosas propiedades beneficiosas para la salud (Yubero-Serrano et al., 2018).

1.2 EL ACEITE DE OLIVA

El aceite de oliva es un producto vegetal extraído del fruto del olivo (*Olea europaea* L.) que el ser humano ha utilizado desde hace siglos no solamente como alimento, sino también con fines cosméticos y farmacéuticos (Mazzini, 2000). El principal país productor de este aceite es España (fig. 5), que en el año 2017 ya producía más de la mitad de todo el aceite de oliva comercializado a nivel mundial, siendo la provincia de Jaén la que contribuye con una mayor cantidad de toneladas. Por este motivo, resultan de gran interés socioeconómico las investigaciones científicas que apoyen y demuestren los beneficios que el aceite de oliva tiene sobre la salud.

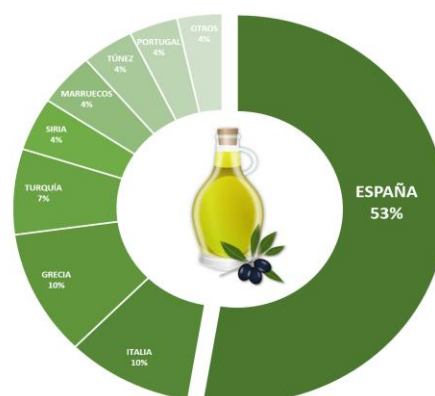


Figura 5. Producción mundial de aceite de oliva. Elaboración propia con datos del 2017 del COI:

<http://www.internationaloliveoil.org/>.

1.2.1 Tipos

Los aceites de oliva se distinguen en función de su método de extracción. Siguiendo las directrices marcadas por el Consejo Oleícola Internacional (COI), podemos diferenciar dos grandes grupos: los aceites de oliva vírgenes (AOV), extraídos únicamente por procedimientos

físicos para evitar la pérdida de propiedades, y otros tipos de aceites de oliva de menor calidad, como los aceites de oliva refinados (AOR) o los aceites de orujo de oliva, obtenidos ambos con la ayuda de procesos físico-químicos. De forma genérica, los AOV aptos para el consumo humano son:

- i. Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE): aceite con una acidez, expresada en concentración de ácido oleico, que no supere el 0,8 % p/p. Este aceite conserva las características organolépticas y una composición química propias de un aceite de gran calidad. Destaca su perfil lipídico rico en grasas monoinsaturadas que, junto con la concentración de componentes minoritarios bioactivos, le otorgan diferentes propiedades beneficiosas sobre la salud de las que se hablará más adelante.
- ii. Aceite de Oliva Virgen (AOV): aceite con una acidez, expresada en concentración de ácido oleico, que no supere el 2 % p/p. Este tipo de aceite posee habitualmente alguna tara sensorial (defectos en su aroma y acidez elevada, principalmente), que suele estar asociada a ligeros cambios químicos en alguno de sus componentes y que conlleva la pérdida de alguna de sus propiedades.
- iii. Aceite de Oliva Virgen corriente: aceite con una acidez, expresada en concentración de ácido oleico, que no supere el 3,3 % p/p. A diferencia de los anteriores, la comercialización de este aceite es más restrictiva, ya que sólo puede venderse directamente al consumidor en algunos países dependiendo de la normativa establecida.

En ocasiones, algunos AOV no son aptos para el consumo humano, por ejemplo, por su acidez elevada. Para poder comercializarlos, estos aceites han de someterse a una serie de procedimientos físico-químicos que componen el proceso de refinado del aceite. Este proceso da lugar a los AOR, que pueden ser comercializados en bruto o mezclados con otros AOV.

I.2.2 Composición

La composición del aceite de oliva es muy variable, pero puede simplificarse en función de la capacidad de saponificar de sus componentes (Matáix-Verdú y Martínez de Victoria-Muñoz, 1988). Así, estos pueden dividirse en:

- i. Fracción saponificable: es la fracción mayoritaria del aceite de oliva pues llega a suponer hasta el 98 % de su composición. En ella encontramos principalmente ácido oleico (C18:1) y en mucha menor medida, ácido palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), esteárico (C18:0) y linolénico (C18:3). Estos ácidos aparecen mayoritariamente esterificados en forma de triacilglicéridos (TAG), aunque también pueden encontrarse formando diacilglicéridos, monoacilglicéridos y, en un porcentaje mucho menor, en su forma libre. Al ácido oleico, componente mayoritario del aceite de oliva, se le han atribuido múltiples propiedades beneficiosas sobre la salud humana que se tratarán posteriormente.
- ii. Fracción insaponificable: pese a tener una representación minoritaria (2 %), contiene numerosos componentes con propiedades saludables demostradas. Esta fracción se ve seriamente dañada con los procesos de refinado del aceite, llegándose a perder prácticamente en su totalidad en los AOR. Por este motivo, la fracción insaponificable es la que establece la gran diferencia que existe entre los AOVE y los AOR (tabla 1).

	AOVE	AOR
Fracción saponificable	Concentración (g/100g)	
Palmítico, 16:0	6,6	9,1
Palmitoleico. 16:1 (n-9)	0,1	0,1
Heptadecenoico, 17:1 (n-7)	0,4	0,6
Esteárico, 18:0	2,8	3,4
Oleico, 18:1 (n-9)	83,1	78,6
Linoleico, 18:2 (n-6)	5,1	6,2
γ-Linoleico 18:3 (n-6)	0,4	0,5
α-linoleico, 18:3 (n-3)	0,6	0,4
Fracción insaponificable	Concentración (g/100g)	
α-tocoferol	300	200
Escualeno	4277	2598
Polifenoles	800	60

Tabla 1. Ejemplo de composición genérica de los AOVE y AOR. Adaptada de (Ramírez-Tortosa et al., 1999).

Los integrantes de la fracción insaponificable pueden a su vez subdividirse en dos grupos: compuestos derivados de ácidos grasos, como los fosfolípidos, las ceras y los ésteres de esteroides; y compuestos químicamente no relacionados con los ácidos grasos, entre los que se encuentran hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos. Gran parte de la investigación científica sobre el aceite de oliva se ha centrado en el estudio de estos últimos. Se ha demostrado, por ejemplo, que la composición de la fracción fenólica varía dependiendo de múltiples factores que influyen en la calidad del aceite, como las características de su almacenamiento (Okogeri y Tasioula-Margari, 2002) o la variedad que lo origine (Lerma-García et al., 2008). Los componentes que forman la fracción fenólica del aceite pueden dividirse en (Serreli y Deiana, 2018):

- i. Secoiridoides: siendo el más abundante la forma dialdehídica del ácido eleanólico ligado a otros compuestos.
- ii. Feniletanoides: destacan en este grupo el hidroxitirosol (HT), el tirosol o el oleocantal.
- iii. Ácidos fenólicos: como el ácido gálico, el ácido vanílico o el ácido cafeico.
- iv. Flavonoides: como la luteolina, formados por dos anillos bencénicos unidos por una cadena lineal de 3 carbonos.
- v. Hidroxi-isocromanos: con dos únicos representantes, el 1-fenil-6,7-dihidroxi-isocromano y el 1-(39-metoxi-49-hidroxi) fenil,6,7-dihidroxi-isocromano.
- vi. Lignanos: cuya estructura está basada en la condensación de aldehídos aromáticos.

La proporción concreta de estos compuestos en el AOVE y su perfil lipídico hacen de este aceite un alimento con múltiples propiedades beneficiosas que han sido ampliamente demostradas en el ámbito médico-científico.

I.2.3 Propiedades saludables del aceite de oliva

La DM es el patrón alimentario seguido por gran parte de los habitantes de esta zona geográfica, y está basada en el consumo diario de productos frescos de la región como frutas, verduras, cereales, frutos secos y legumbres. Estos alimentos están acompañados eventualmente por marisco, pescado y una ingesta limitada de carne y alcohol, principalmente, vino tinto (Davis et al., 2015). La relación de este tipo de alimentación con un estilo de vida saludable ha quedado patente en numerosos trabajos de investigación

(Dussailant et al., 2016; Tosti et al., 2018). Por ejemplo, hay evidencias de que la DM, gracias a su elevada relación de ácidos grasos monoinsaturados/saturados, mejora el perfil lipídico plasmático (Bos et al., 2010), lo que a su vez reduce el riesgo de padecer diabetes de tipo 2 (de Lorgeril, 2011; Razquin et al., 2018). Pero el estudio que hasta la fecha ha demostrado, a mayor escala, la relación de este patrón alimentario con la salud es el ensayo clínico PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea; Zazpe et al., 2008). Los resultados derivados de este estudio han servido para demostrar la capacidad preventiva de la DM, y especialmente de la suplementada con AOVE, sobre la incidencia de complicaciones cardiovasculares mayores como infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (Ros et al., 2014; Amor et al., 2017). Los efectos beneficiosos del AOVE se han atribuido, al menos parcialmente, a su acción antiinflamatoria y antioxidante (Martínez-González et al., 2015), ambas demostradas en múltiples modelos experimentales. Aunque pocos autores han probado el efecto directo del AOVE sobre modelos de cultivos celulares, Rossi y colaboradores (2017) comprobaron que en mioblastos murinos no tumorales y en células humanas monocíticas procedentes de leucemia, este tratamiento fue capaz de mejorar el nivel de estrés oxidativo provocado por el agente oxidante hidroxiperóxido de cumeno. Además, en este trabajo el AOVE inhibió el crecimiento celular de forma exclusiva en la línea celular leucémica. En otro modelo *in vitro* de plaquetas procedentes de personas sanas, el AOVE también ejerció acción antioxidante a través de la neutralización directa del peróxido de hidrógeno, una de las ERO más abundante (Carnevale et al., 2018). En modelos *in vivo* de ratones, se ha comprobado recientemente un efecto antiinflamatorio del AOVE, acompañado de una mejora en las lesiones ateroscleróticas (Luque-Sierra et al., 2018). Este estudio propone la utilidad de este aceite en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares no sólo como agente preventivo, como ya sugería PREDIMED, sino también como un buen complemento al tratamiento una vez han aparecido las complicaciones. En humanos, se ha visto como una intervención nutricional con AOVE conseguía contrarrestar la menor actividad asociada a la edad de algunos sistemas antiinflamatorios y antioxidantes como las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la paraoxonasa-1, enzima que contribuye al control del estado oxidativo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL; Loued et al., 2013). En esta línea, se han encontrado evidencias de la acción del AOVE sobre los niveles de ERN y ERO, así como de su acción directa sobre los sistemas antioxidantes. Así, para estudiar el efecto de la DM y el AOVE en el metabolismo oxidativo, se han llevado a cabo distintas intervenciones nutricionales en humanos (Oliveras-

López et al., 2013; Toledo et al., 2017). Cabe destacar el estudio llevado a cabo por Martínez-González y colaboradores (2015), en el que tras 1 año de intervención nutricional con DM se logró aumentar la capacidad antioxidante total en el plasma de pacientes con un elevado riesgo cardiovascular, siendo este aumento mayor en la DM suplementada con AOVE que en aquella suplementada con nueces. Con el consumo de AOVE, también se ha logrado reducir los niveles de oxidación del ADN en mujeres postmenopáusicas (Salvini et al., 2006), uno de los grupos poblacionales más afectados por la FM. En este sentido, nuestro grupo ya comprobó que una intervención con este aceite en pacientes de FM daba lugar a una mejora de su estado oxidativo, protegiendo frente al daño por oxidación de proteínas, lípidos y ADN (Rus et al., 2016b).

Por otro lado, otros autores han puesto de manifiesto el efecto beneficioso de los diferentes componentes del AOVE por separado. En este sentido, se ha demostrado que el principal ácido graso de la fracción saponificable y componente mayoritario del AOVE, el ácido oleico, posee una importante capacidad antiaterogénica (Cabello-Moruno et al., 2007) y antitumoral (Carrillo et al., 2012), contrarresta la resistencia a la insulina (Perdomo et al., 2015) y disminuye la reacción inflamatoria (Medeiros-de-Moraes et al., 2018). De igual modo, distintos estudios señalan a la fracción insaponificable como responsable de muchos de los beneficios asociados al consumo de AOVE, algunos de los cuales están íntimamente relacionados con la etiopatogenia de la FM. El efecto antiinflamatorio de esta fracción se ha evaluado en un importante número de estudios y modelos. En macrófagos murinos estimulados con lipopolisacárido (LPS) se comprobó que la fracción insaponificable del aceite era capaz de disminuir la respuesta proinflamatoria (Cárdeno et al., 2014). En este estudio, el tratamiento redujo la expresión de ciclooxigenasa-2, una enzima íntimamente relacionada con un estado proinflamatorio, así como la producción de ERO y ERN. Por su parte, el escualeno ejerció una acción antiinflamatoria en células del sistema inmune humano (Sánchez-Quesada et al., 2018), mientras que los tocoferoles se han utilizado como antioxidantes y antitumorales en distintos modelos experimentales (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996; Yoshida et al., 2003; Bak et al., 2018). Por otro lado, los compuestos fenólicos del AOVE han sido evaluados en múltiples patologías y modelos experimentales (Visioli et al., 2002; Cicerale et al., 2010; Cicerale et al., 2012). Así, se ha comprobado que un extracto de estos compuestos protege frente a la disfunción endotelial, regulando los niveles intracelulares de

óxido nítrico (NO; Storniolo et al., 2014). Igualmente, se ha podido demostrar una correlación positiva entre los niveles de compuestos fenólicos totales excretados (procedentes de una ingesta controlada de AOVE) y los niveles de NO en plasma, cuyo incremento se asoció a una reducción de la presión sanguínea (Medina-Remón et al., 2015). Asimismo, los fenoles del AOVE también se han propuesto como potenciales candidatos en la lucha contra las alteraciones inflamatorias crónicas (Casas et al., 2018), categoría en la que se encuadra la FM. En línea con esta hipótesis, el estudio de Camargo y colaboradores (2010) demostró que una ingesta elevada de aceite de oliva enriquecido en fenoles inhibía la expresión de varios genes proinflamatorios en células mononucleares humanas de sangre periférica, actuando sobre la ruta NF- κ B/AP-1 y sobre la interacción citoquina-receptor. De hecho, un extracto de fenoles obtenido directamente del AOVE redujo la expresión de citoquinas proinflamatorias en un modelo experimental de artritis reumatoide (Rosillo et al., 2014), una patología que comparte síntomas con la FM. Esta fracción del AOVE también se han relacionado con la reducción de distintos marcadores de daño oxidativo como las LDL oxidadas o el daño ocasionado en el ADN (Raederstorff, 2009). Por último, un estudio llevado a cabo sobre 55 variedades de AOVE señaló una correlación directa del contenido en HT, tirosol y oleuropeína con el efecto antioxidante diferencial de estos aceites (Bayram et al., 2012). En todos ellos, el contenido en HT suponía hasta un 40 % de los compuestos fenólicos totales sugiriéndose, por tanto, el papel principal del HT en esta actividad.

1.2.4 El hidroxitirosol: un compuesto bioactivo del aceite de oliva virgen extra

1.2.4.1 Generalidades

El HT, 3,4-dihidroxifeniletanol o 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (fig. 6), es un fenol anfipático perteneciente al grupo de los feniletanoides, compuestos derivados de los alcoholes fenéticos. Una de las principales fuentes de HT libre en los AOVE es la hidrólisis de secoiridoides como la oleuropeína (fig. 7), un proceso

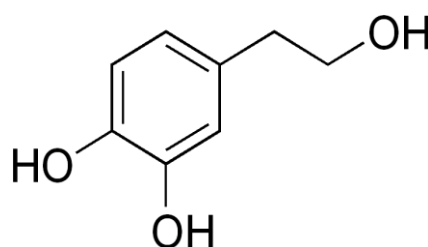


Figura 6. Estructura química del HT.

que ocurre durante la maduración del fruto del olivo (Charoenprasert y Mitchell, 2012) o el almacenamiento de los AOVE. Este compuesto bioactivo ha sido estudiado ampliamente en la

literatura científica debido a sus múltiples propiedades beneficiosas (Robles-Almazán et al., 2018), algunas de las cuales inciden en aspectos íntimamente relacionados con la etiopatogenia de la FM.

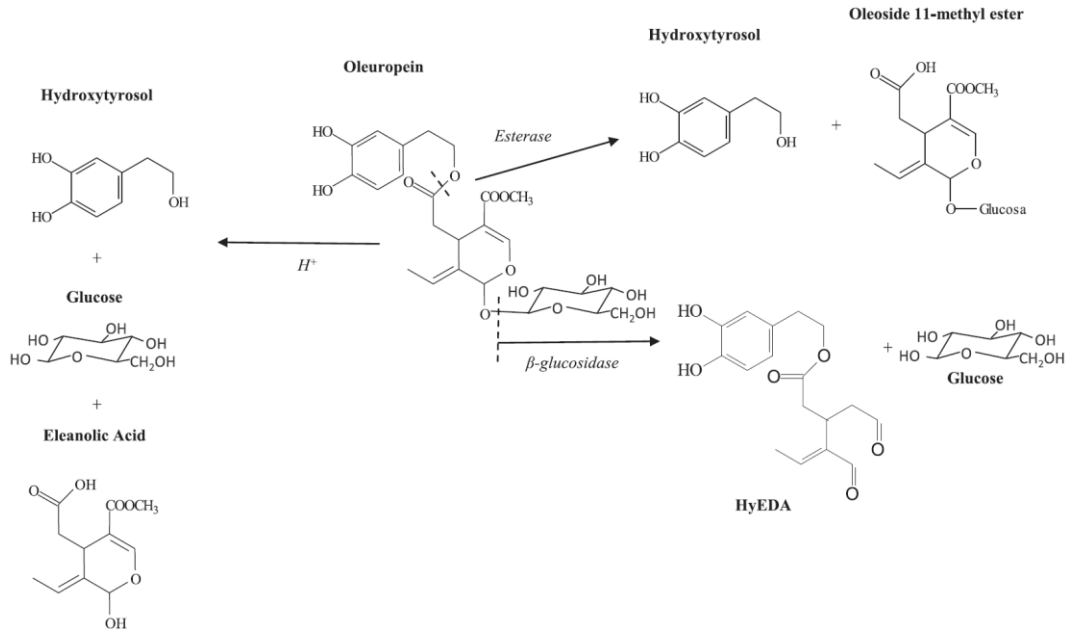


Figura 7. Metabolitos resultantes de la hidrólisis ácida y enzimática de oleuropeína (Ramírez et al., 2016).

1.2.4.2 Biodisponibilidad

El HT se absorbe principalmente por transporte pasivo en el intestino delgado y en el colon. Esta absorción es favorecida si la fuente de la que procede es el aceite de oliva, llegando a alcanzar una biodisponibilidad del 99 % (Tuck et al., 2001). En este proceso se ha comprobado que la microbiota intestinal tiene un papel importante como modulador de su absorción, dado que actúa sobre los compuestos que contienen HT en su estructura (como la oleuropeína) y lo liberan en su forma libre (Mosele et al., 2014). Una vez absorbido, la vida media del compuesto en plasma está en torno a los 2 minutos, pues pasa rápidamente a formar parte de los distintos tejidos. La distribución en el organismo del HT es muy amplia, pudiendo encontrarse en músculo, hígado, riñón e incluso en el cerebro (D'Angelo et al., 2001). Además, en un estudio llevado a cabo en ratas, se sugirió que la transformación y uso del HT dependía del sexo, pudiendo ser más efectiva en las hembras (Serra et al., 2012).

El tipo de aceite es un factor determinante en la concentración de los compuestos fenólicos en general y del HT en particular. En este sentido, Pastor y colaboradores (2016) comprobaron que la concentración de HT libre en el plasma humano era indetectable cuando procedía de aceite de oliva, pero muy elevada cuando se administraba AOVE. Si bien es cierto que la concentración de fenoles varía enormemente entre los distintos AOVE, en algunas variedades como la variedad local Picual puede llegar a alcanzar los 600 mg/kg (Rigacci y Stefani, 2016). Precisamente, un AOVE de esta variedad (tabla 2), con una concentración de fenoles totales de 553,8 mg/l se utilizó en un estudio de la relación entre la ingesta de este aceite y la capacidad antioxidante total de quien lo consumió (Oliveras-López et al., 2013). Los resultados de este estudio demostraron que las pacientes que consumían AOVE presentaban tras la ingesta unos niveles de HT en plasma en torno a 0,2 µg/ml (1,3 µM), superando en 0,05 µg/ml el nivel de las pacientes que no lo consumieron.

Compuesto fenólico	Concentración (mg/l)
HT	1,73 ± 0,03
3,4-DHPE-EA	71,26 ± 5,01
3,4-DHPE-EDA	93,54 ± 7,24
Fenoles totales	553,8

Tabla 2. Composición del AOVE utilizado en el estudio de Oliveras-López y colaboradores (2013). Adaptada.

1.2.4.3 Propiedades beneficiosas

El HT es un compuesto con múltiples actividades biológicas entre las que destacan su capacidad antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, neuroprotectora y cardioprotectora (Robles-Almazán et al., 2018). De todas ellas, y dadas las características de la FM, resultan de gran interés su efecto antiinflamatorio y antioxidante.

El efecto del HT como agente antiinflamatorio se ha probado en distintos modelos *in vivo* e *in vitro*. En un modelo de artritis reumatoide en roedores, un AOR suplementado con HT mejoró el estado proinflamatorio asociado a esta patología (Silva et al., 2015b). En condrocitos derivados de pacientes con osteoartritis, este fenol inhibió la respuesta inflamatoria fomentando la autofagia (Zhi et al., 2018). Este mismo tratamiento sobre monocitos humanos permitió reducir la formación de moléculas proinflamatorias como el NO o el factor-α de necrosis tumoral (TNF-α), inhibiendo también la expresión de la metaloproteinasa-9 de la matriz (MMP-9) y de la ciclooxigenasa-2 (Zhang et al., 2009; Scoditti et al., 2014). Igualmente, en macrófagos se ha demostrado la capacidad del HT para modular

la producción de NO, de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y de citoquinas quimiotácticas (Richard et al., 2011). En esta línea, ya hay estudios que apuntan al uso directo del HT como agente antiinflamatorio. Así, un estudio publicado recientemente demostró la capacidad antiinflamatoria de una crema tópica de formulación basada en HT con excelentes resultados, pues su aplicación redujo los niveles de expresión de las citoquinas IL-1 e IL-8 en un modelo de epidermis humana (Smeriglio et al., 2019). Estas evidencias acerca del efecto sobre las distintas rutas proinflamatorias a diversos niveles que el HT podría ejercer, apoyan la hipótesis que señala a este fenol como uno de los de mayor poder antiinflamatorio del aceite de oliva.

El HT es, además, uno de los compuestos fenólicos de mayor capacidad antioxidante (Bayram et al., 2012). En su estructura molecular, la presencia del grupo hidroxilo en la posición orto es la responsable de la mayor capacidad reductora que este ejerce en comparación con otras moléculas de su familia, como el tirosol (Balducci et al., 2018). Esta estructura le permite la formación de enlaces de hidrógeno entre sus radicales fenoxilo y su grupo hidroxilo (Visioli et al., 2002). Así, en modelos *in vitro*, el tratamiento con HT protegió a las LDL de la oxidación, disminuyendo los niveles de peroxidación lipídica (Visioli et al., 1995). En modelos *in vivo*, se ha visto que, a nivel intracelular, el HT es capaz de actuar en la reducción del peróxido de hidrógeno producido en las mitocondrias de neutrófilos humanos (O'Dowd et al., 2004). En esta línea, un estudio de Oliveras-López y colaboradores (2013) encontró correlación positiva entre el aumento de los niveles de HT plasmático en las pacientes que consumían AOVE y una mayor capacidad antioxidante total reflejada en una mayor actividad de la enzima antioxidante CAT. El HT también podría proteger frente al daño oxidativo al ADN de células hepáticas (Li et al., 2012). En estas células, el tratamiento con HT redujo el daño oxidativo producido por el ortofenilfenol, aumentando los niveles de GSH y protegiendo la integridad de las membranas lisosomales y mitocondriales. Recientemente, se ha probado el efecto antioxidante del HT en combinación con la vitamina E en pacientes con hígado graso no alcohólico, mejorando la esteatosis, los niveles de TAG, aumentando la concentración de GSH y la ratio GSH/glutatión disulfuro y disminuyendo el nivel de proteínas carboniladas y de

productos finales de glicosilación avanzada (Nobili et al., 2019). Además, el HT protege frente a la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno, incrementando la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (Zhu et al., 2010). También se ha demostrado la acción antioxidante del HT a nivel transcripcional. Así, el HT protege del estrés oxidativo al: i) inducir la expresión de enzimas detoxificantes de fase II mediante la liberación del factor de transcripción *NRF2*, y ii) favorecer la biogénesis mitocondrial gracias a su acción sobre el coactivador 1α del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PGC-1α; fig. 8; Hao et al., 2010; Zhu et al., 2010).

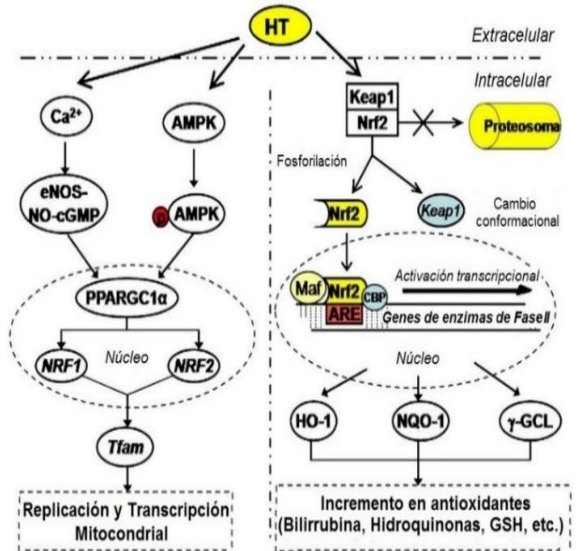


Figura 8. Modelo propuesto de acción protectora del HT frente al estrés oxidativo producido por acroleína. Adaptada de Zhu y colaboradores (2010).

1.3 PROTEÓMICA: UNA HERRAMIENTA CON APLICACIONES CLÍNICAS

Las técnicas ómicas desarrolladas en el campo de la biología han supuesto un enorme avance para el conocimiento y la aproximación a enfermedades de carácter complejo como la FM. Este tipo de análisis permite realizar un estudio global del conjunto de genes (genómica), transcritos (transcriptómica) o proteínas (proteómica) de una muestra biológica (fig. 9). Más recientemente, se han acuñado otros términos para referirse al estudio global de los metabolitos (metabolómica) o de las interacciones entre las distintas moléculas (interactómica), pero todos ellos comparten un nexo común: abordan el estudio de los sistemas biológicos desde un punto de vista global.

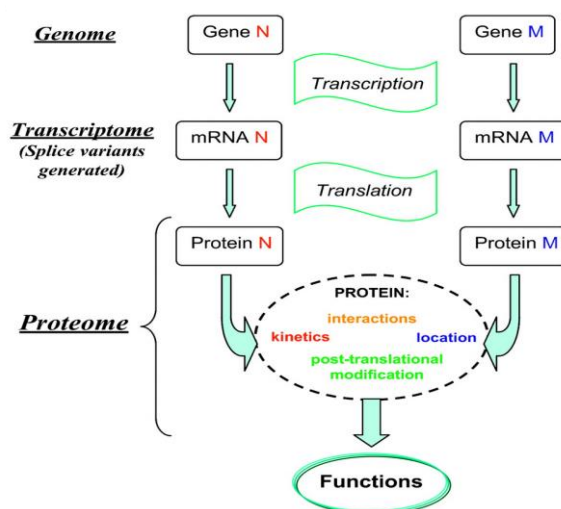


Figura 9. Niveles de estudio principales de las técnicas ómicas (Cristea et al., 2004).

Dentro de las ómicas, la encargada del análisis en conjunto de las proteínas que conforman un sistema biológico, así como de las interacciones y modificaciones en las que estas participan es, como ya se ha mencionado, la proteómica (Cristea et al., 2004). En función del fin con el que se utilice, un estudio de proteómica puede definirse como cualitativo, si únicamente persigue la caracterización del perfil proteómico; funcional, si lo que se quiere estudiar es la interacción entre proteínas o de estas con otras macromoléculas; o cuantitativo, en caso de que el interés del estudio se focalice en estudiar cambios en la expresión de proteínas entre dos condiciones determinadas (Ortea et al., 2016). Aunque la elección de un tipo de análisis proteómico u otro modificará el orden de alguna de las fases del estudio (fig. 10), la mayor parte se basan en la separación de las proteínas y en el posterior análisis de estas por espectrometría de masas (MS).

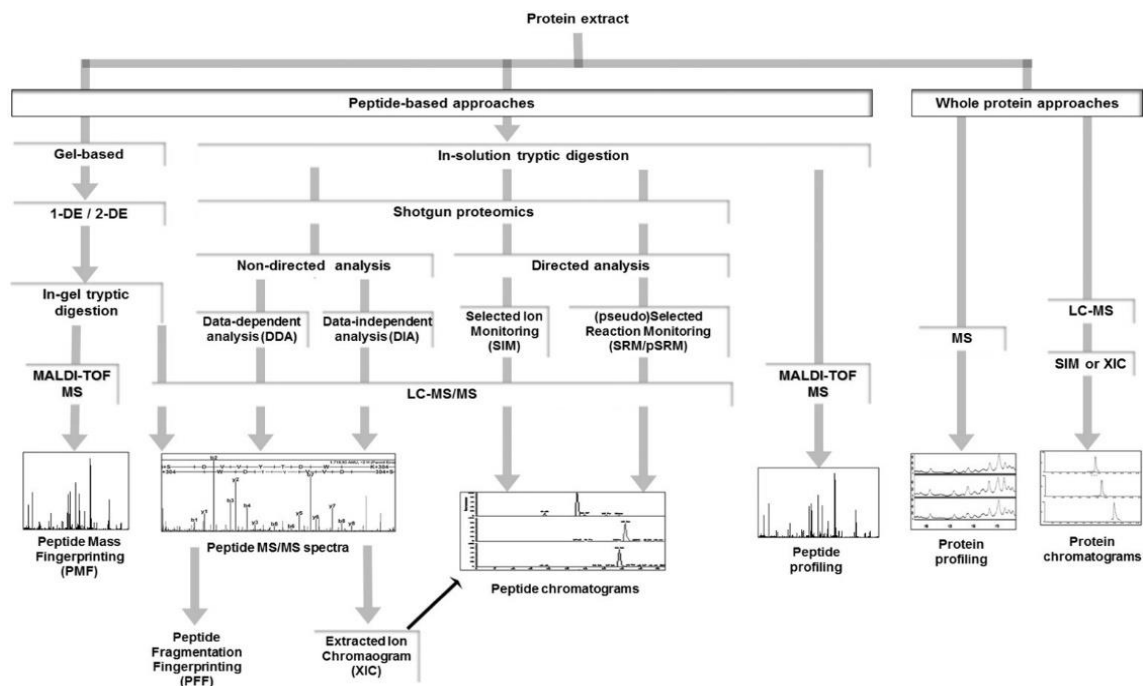


Figura 10. Distintos análisis proteómicos y sus fases (Ortea et al., 2016).

De forma genérica, un estudio proteómico basado en MS puede dividirse en tres fases: (i) la preparación de las muestras, (ii) la separación de la mezcla peptídica y (iii) el análisis de los péptidos resultantes (Strathmann y Hoofnagle, 2011). En el caso de los análisis proteómicos a gran escala, las muestras son inicialmente preparadas mediante digestión enzimática (generalmente con tripsina) con el objeto de degradar las proteínas en péptidos de menor tamaño en el paso previo a la separación. La separación es el procedimiento en el que hay mayores diferencias entre las técnicas proteómicas. Así, pueden llevarse a cabo

separación mediante electroforesis, en una (1-DE) o dos dimensiones (2-DE), o separación por cromatografía líquida (LC), más reciente y extendida en los análisis proteómicos. El proceso de identificación y cuantificación de los péptidos también puede abordarse mediante dos estrategias: se puede hacer algún tipo de marcaje de las muestras (previo o posterior al proceso de separación peptídica), o utilizar una cuantificación libre de marcaje. Aunque los marcajes permiten la cuantificación absoluta y el análisis de muestras de forma simultánea, es habitual que los análisis proteómicos a gran escala actuales carezcan del marcaje (*label-free*), optando por una cuantificación relativa que tiene mayor sensibilidad (Smith et al., 2019). La fase posterior de análisis de los péptidos por MS se compone a su vez de tres procesos bien identificados: (i) la ionización peptídica, (ii) la separación e identificación de los iones en función de su relación masa/carga (m/z) y, (iii) el cálculo del área del pico de intensidad para su cuantificación. En primer lugar, la ionización de la muestra se puede llevar a cabo mediante el uso de láser o de electrospray (ESI), proceso que permite el análisis de los péptidos en el espectrómetro de masas. Este analizador puede ser del tipo tiempo-de-vuelo (TOF) o, más comúnmente, de cuadrupolo dispuestos en conformación única o en tándem para una mayor sensibilidad y precisión (Chandramouli y Qian, 2009). Lo más habitual es que se utilicen los analizadores de cuadrupolo dispuestos en tándem, pues la identificación de un solo analito con una determinada relación m/z no resulta tan específica (Strathmann y Hoofnagle, 2011). Una vez identificados los péptidos, se procede a la cuantificación proteica, para la que existen varias aproximaciones (fig. 11). En el caso de las técnicas libres de marcaje la cuantificación tiene lugar basándose en el recuento espectral o en las corrientes de iones. El primer caso basa el cálculo de la abundancia relativa de cada proteína en el total de veces que alguno de los péptidos que esta ha generado es identificado por el sistema (Mueller et al., 2008). Este tipo de análisis semicuantitativo posee limitaciones, pues la relación de este valor con la abundancia de la proteína no es muy fiable (Cutillas y Timms, 2010). Así pues, el uso de las corrientes de iones suele ser el método elegido. En este

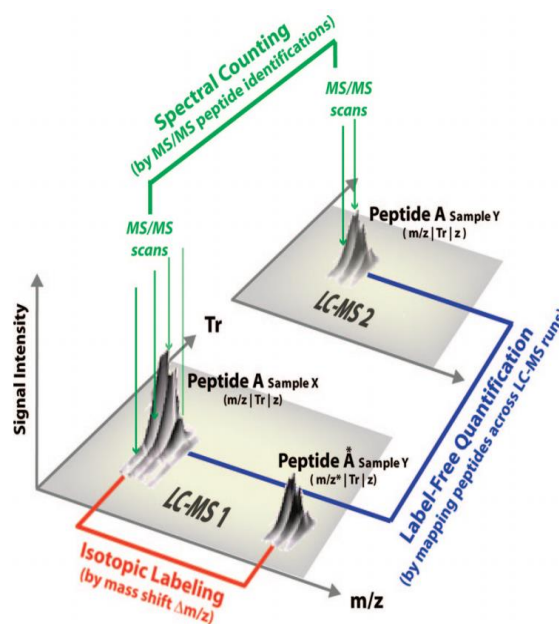


Figura 11. Métodos de cuantificación en los estudios de proteómica basados en LC-MS/MS (Mueller et al., 2008).

método, cada péptido ionizado genera un pico de intensidad en función de su valor de tiempo de retención y masa, valores que, al añadirles el valor de carga, servirán para que este sea reconocido en la base de datos utilizada en el análisis (Mascot, Proteome Discoverer, etc.). Tras identificar la proteína originaria de cada péptido en el programa, se suman los valores de los 3 picos peptídicos más intensos de cada proteína para poder calcular su abundancia relativa (Cutillas y Timms, 2010). El análisis diferencial entre condiciones finaliza con el establecimiento de uno de los cromatogramas como referencia y el alineamiento sobre este de los picos de intensidad del resto (Mueller et al., 2008). Ambos serán comparados mediante tests estadísticos para discernir cuáles de ellos tienen expresión diferencial entre las distintas muestras.

Puesto que los análisis proteómicos generan una gran cantidad de datos, las herramientas bioinformáticas se han erigido como elementos clave para el manejo de los mismos y para la obtención de conclusiones (Popov et al., 2009). De este modo, las webs que en un principio comenzaron siendo simples repositorios de datos genómicos y proteómicos han ido convirtiéndose progresivamente en bases de datos integradas e interconectadas que, en la actualidad, con la ayuda de distintas herramientas como *Gene Ontology*, *PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships)*, *DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery)*, *KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)* o *IPA (Ingenuity Pathway Analysis)* permiten sacar el máximo partido a los experimentos proteómicos (Calderón-González et al., 2016). Este avance en el análisis de datos ha permitido, junto a la evolución de los sistemas de procesamiento y análisis de las muestras, agilizar considerablemente los tiempos en la investigación en el ámbito de la proteómica. Esta circunstancia, unida a su capacidad para estudiar con gran sensibilidad sistemas complejos, ha hecho que este análisis se comenzara a aplicar en clínica como herramienta de aproximación al diagnóstico desde un primer momento (Rudert, 2000). Concretamente, la proteómica suele ser muy útil en la búsqueda de biomarcadores (Barallobre-Barreiro et al., 2013), entendiendo como biomarcadores aquellos valores antropométricos, biológicos, fisiológicos, bioquímicos, etc., que puedan ser medidos de manera objetiva para poder identificar, principalmente, procesos fisiológicos o patológicos, e incluso una respuesta farmacológica a una terapia (Strimbu y Tavel, 2010). En este sentido, ya ha sido utilizada para buscar predictores de la toxicidad y respuesta a fármacos antitumorales, contribuyendo al

avance en la investigación en distintos tipos de cáncer (Stoehlmacher, 2006; Galvao et al., 2011; Qiu et al., 2019; Shen et al., 2019). Las técnicas proteómicas también se han aplicado en el estudio de la esclerosis (Balanesu et al., 2014), la osteoartritis (Li et al., 2007) o en la detección de marcadores asociados a la inflamación pulmonar (Montuschi, 2009). Para este fin, la combinación de nano LC con espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS; fig. 12) ha sido una de las aproximaciones más utilizadas, dado su amplio rango dinámico de detección (Sandin et al., 2015). Así, esta técnica se ha aplicado en el procesamiento de muestras complejas como el suero (Levin et al., 2007). Su gran sensibilidad se ha aprovechado también para detectar niveles de hormonas sexuales en sangre (Hirsh y Ben-Dor, 2016) o para desarrollar fármacos y monitorizar su metabolismo (Song et al., 2005; Marzo y Bo, 2007).

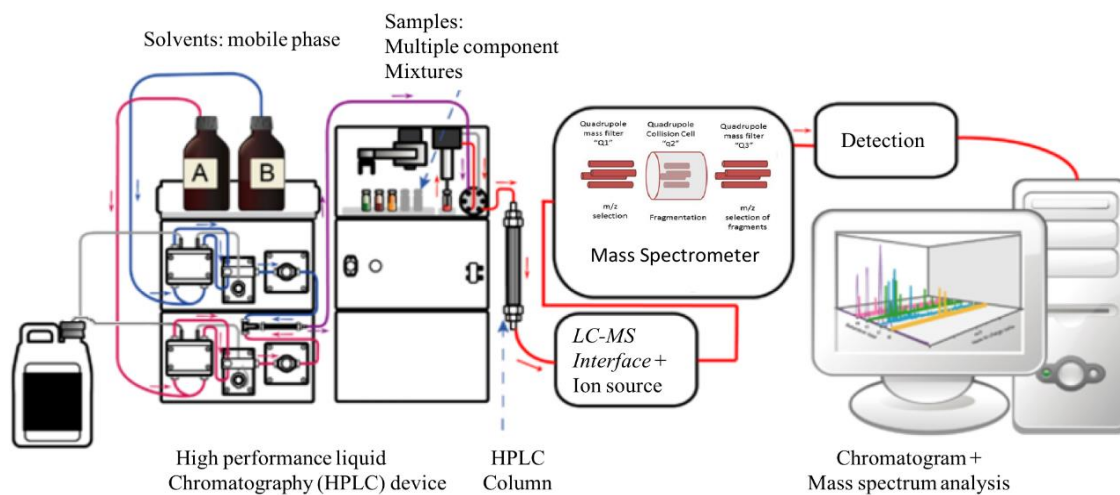


Figura 12. Esquema del funcionamiento de la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Fuente: adaptación propia de imágenes bajo licencia Creative commons.

La proteómica también se ha aplicado en la investigación de la FM, llevándose a cabo algunos estudios proteómicos preliminares en pacientes, principalmente en saliva, suero y líquido cefalorraquídeo. Así, un estudio de 2-DE/MS en saliva de pacientes propuso como potenciales marcadores de la patología a un grupo de proteínas entre las que se encontraban el precursor de la proteína relacionada con la haptoglobina o las calgranulinas A y C (Bazzichi et al., 2009), estas dos últimas confirmadas con posterioridad mediante otras técnicas proteómicas aplicadas por el mismo grupo (Giacomelli et al., 2011). Otro estudio posterior en suero de pacientes, también realizado por 2-DE/MS, encontró 3 proteínas con expresión diferencial en FM: la α 1-antitripsina, la transtirretina y la proteína 4 de unión a retinol (Ruggiero et al., 2014). En esta línea, recientemente se ha aplicado la técnica de nLC-MS/MS

en el líquido cefalorraquídeo de enfermas de FM, aproximación que ha permitido encontrar cambios en el perfil proteico de estas pacientes con respecto a las mujeres sanas (Khoonsari et al., 2019). Estos estudios ratifican la utilidad de la proteómica en el estudio de la FM y evidencian la necesidad de continuar investigando en este ámbito para encontrar marcadores que ayuden a su diagnóstico y tratamiento.

II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1 HIPÓTESIS

La FM es una forma de reumatismo no articular de etiología desconocida, aunque se la ha relacionado con un incremento del nivel de estrés oxidativo y con alteraciones inflamatorias. Este hecho dificulta su diagnóstico y tratamiento, haciendo imprescindible una investigación multidisciplinar en este campo. La proteómica permite el análisis sistemático y con gran sensibilidad de las proteínas que se expresan en muestras complejas. Por tanto, se está convirtiendo en una técnica clave para identificar las rutas moleculares que se alteran en diferentes enfermedades, y se comienza a aplicar en clínica como herramienta de aproximación diagnóstica. En este sentido, la aplicación de la proteómica para caracterizar los cambios moleculares asociados a la FM en plasma (estudio *in vivo*) y en fibroblastos dermales (estudio *in vitro*) podría ser de gran utilidad. Por otra parte, el AOVE, principal fuente de grasa de la dieta mediterránea, posee numerosas propiedades beneficiosas entre las que destacan su capacidad antioxidante y antiinflamatoria. Estas características están muy relacionadas con la acción de sus componentes minoritarios y, especialmente, con el HT, uno de sus principales compuestos fenólicos. En base a estos antecedentes, cabría esperar que el AOVE y el HT ejercieran un efecto normalizador en los cambios moleculares asociados a la FM.

II.2 OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es caracterizar los cambios moleculares asociados a la FM mediante el análisis del proteoma plasmático (estudio *in vivo*) y de fibroblastos dermales (estudio *in vitro*), y evaluar el efecto que sobre ellos tienen el AOVE y el HT. Para ello, los objetivos específicos a desarrollar son:

1. Caracterizar los cambios en el proteoma plasmático asociados a la FM.
2. Analizar el posible efecto beneficioso del AOVE sobre los cambios del proteoma plasmático de las pacientes de esta patología.
3. Caracterizar los cambios asociados a la FM en el proteoma de fibroblastos dermales de una paciente.
4. Evaluar el posible efecto normalizador del HT en el proteoma de estas células

III.MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 MODELO *IN VIVO*: ESTUDIO EN PLASMA

La primera parte del estudio se llevó a cabo en el plasma de tres grupos de mujeres (i) sanas (SANAS), (ii) pacientes de fibromialgia (FM) y (iii) pacientes de FM que siguieron una dieta enriquecida en AOVE (FMA).

III.1.1 Mujeres participantes en el estudio. Criterios de inclusión y exclusión.

En este estudio participaron dos grupos de mujeres: 12 sanas, procedentes de la Universidad de Jaén, y 23 pacientes de FM pertenecientes a la Asociación de Fibromialgia de Jaén (Afixa). Para su inclusión, las participantes debían tener una edad superior a los 18 años y un índice de masa corporal (IMC) inferior a 35 Kg/m². Además, las mujeres del grupo de FM tenían que haber sido diagnosticadas según los criterios clásicos del ACR para la clasificación de la FM primaria (Wolfe, 1990). Las 35 mujeres aceptaron participar en el estudio firmando el correspondiente consentimiento informado (anexo 1), aprobado tanto por el Comité de Ética de la Universidad de Jaén (anexo 2). El estudio fue llevado a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (2001).

Los criterios de exclusión para las mujeres participantes en el estudio fueron:

- i. Presencia de cualquier otra enfermedad crónica (diabetes mellitus, hipertensión, cáncer, enfermedad cardíaca isquémica).
- ii. Embarazo o lactancia.
- iii. Obesidad de grado II (con un IMC \geq 35 kg/m²).
- iv. Tratamiento farmacológico de corticosteroides, estrógenos, analgésicos, antiinflamatorios, o algún otro medicamento que pudiera afectar a la capacidad antioxidante.
- v. Consumo de alcohol o fumar.

Por otra parte, y con el objeto de mantener al margen el efecto que el ejercicio físico tiene sobre parámetros como el nivel de estrés oxidativo o el metabolismo, todas las mujeres seguían un estilo de vida sedentario. Así, se estableció como criterio de exclusión adicional el realizar actividad deportiva con una frecuencia de más de dos veces por semana, o que conllevara un gasto energético de más de 1000 kcal en ese mismo periodo de tiempo. Para

evitar variaciones en los parámetros de interés, todos los procedimientos y pruebas fueron realizados por el mismo especialista y en el mismo momento del día.

Las características clínicas y demográficas de cada participante se obtuvieron a través de entrevistas y cuestionarios. En las pacientes de FM, el cuestionario de impacto de la fibromialgia (FIQ) se utilizó para evaluar su capacidad funcional y desempeño en las actividades diarias. Este documento está compuesto por ítems puntuados con escala de 0 a 10 puntos, siendo la puntuación máxima alcanzable de 100. Cuanto más próximo a 0 sea el resultado del mismo, mejor se considera la capacidad funcional y calidad de vida de la paciente. El dolor musculoesquelético se determinó mediante la escala visual analógica (EVA: 10 cm), una escala en la que el valor mayor se corresponde con la máxima percepción de dolor por la paciente. El estado de salud percibido a nivel mental (MCS-12) y físico (PCS-12) de todas las participantes en el estudio se determinó mediante la versión en español del cuestionario de salud SF-12 (Vilagut et al., 2008). En este caso, el rango de puntuación se encuentra entre 0 y 100 siendo los valores más próximos a 0 los que implican una peor percepción del estado de salud. Todos los cuestionarios se encuentran recogidos en el anexo 3.

III.1.2 Consumo de una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra en pacientes de fibromialgia

De las 23 pacientes de FM, 11 participaron en un ciclo de intervención nutricional con AOVE (grupo FMA). Dado que la cohorte de pacientes pertenece a una población con un consumo habitual de aceite de oliva, se llevó a cabo un periodo de aclaramiento previo a su participación consistente en la toma de AOR (50 ml/día durante 14 días), de bajo contenido antioxidante. La intervención nutricional consistió en la toma de 50 ml de AOVE en crudo distribuida en tres tomas diarias (en las comidas principales) durante 21 días. Para normalizar la ingesta de antioxidantes y grasas en este grupo de pacientes, un facultativo especialista en nutrición evaluó (por recordatorio 24 horas) y reajustó su dieta.

III.1.3 Obtención y procesamiento de muestras

Las muestras de sangre de las participantes se extrajeron en ayunas y a primera hora de la mañana para evitar variaciones circadianas de los parámetros a analizar. Se utilizaron:

muestras de sangre total para evaluar la velocidad de sedimentación globular (VSG), plasma para el análisis proteómico y las comprobaciones posteriores por western blot y ELISA, y suero para la cuantificación de haptoglobina. El plasma y el suero fueron alicuotados y almacenados a - 80 °C hasta su uso.

III.1.4 Estudio del perfil proteómico

Para analizar, de forma comparada, el perfil proteico plasmático de las participantes se realizó un análisis proteómico por nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem libre de marcaje (*label-free* nLC-MS/MS). Esta técnica permite la cuantificación relativa de la abundancia de cada proteína en cada muestra, siendo posible valorar aquellas con expresión diferencial en los distintos grupos de estudio. Como se detalla más adelante, las proteínas que cumplían este requisito se estudiaron con herramientas bioinformáticas con el objetivo de encontrar rutas moleculares afectadas en la patología.

III.1.4.1 Análisis por nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS)

El plasma de las pacientes se procesó con las columnas para depleción por centrifugación Pierce top 12 (Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez deplecionado, el plasma se digirió con tripsina siguiendo, con ligeras variaciones, el protocolo de preparación de muestras con ayuda de filtro descrito por Wisniewski y colaboradores (2009). Los péptidos resultantes se secaron, se resuspendieron en ácido fórmico al 0,1 % y se sonicaron durante 5 minutos. Tras este proceso preparativo, las mezclas de péptidos se separaron en el sistema nanoACQUITY UPLC (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Electron). El análisis de las muestras se llevó a cabo cargando una alícuota de cada una de ellas en una columna Symmetry 300 C18 UPLC Trap, 180 µm x 20 mm, 5 µm (Waters). La precolumna fue conectada a una columna BEH130 C18, 75 µm x 200 mm, 1,7µm (Waters), y equilibrada con acetonitrilo al 3 % y ácido fórmico al 0,1 %. Los péptidos se eluyeron directamente en el capilar de nanoelectropulverización (Proxeon Biosystems) a 300 nl/min, usando un gradiente lineal de 120 minutos de acetonitrilo al 3-50 %. El espectrómetro de masas ETD Orbitrap XL (Thermo) se utilizó con variación automática entre la adquisición de MS y de MS/MS de forma alterna,

haciendo uso del modo de adquisición dependiente de datos (DDA). Los espectros completos de MS (rango de relación $m/z = 400 - 2000$) se obtuvieron del Orbitrap con una resolución de 30.000 a relación m/z de 400, usando dos masas de bloqueo (445,120024 y 462,146573) para aumentar la precisión de las medidas. Los seis iones más intensos de cada muestra se sometieron a disociación inducida por colisión (CID) en la trampa lineal de iones. Los precursores con estados de carga de 2 y 3 se seleccionaron específicamente para la fragmentación. A medida que se iban analizando los iones, estos eran excluidos de un análisis posterior durante 30 segundos utilizando listas de exclusión dinámica. Finalmente, las búsquedas en la base de datos se realizaron con el software Proteome Discoverer v.1.4 (Thermo Fisher Scientific).

III.1.4.2 Análisis de expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial de las proteínas identificadas se llevó a cabo con el programa Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, Reino Unido). Tras cargar los archivos originales, una de las muestras se seleccionó como referencia y sobre ella se alinearon los picos de intensidad de los iones precursores en el resto de muestras. De este modo, se pudo calcular las relaciones de abundancia relativa entre las muestras a alinear y la referencia, en los diferentes tiempos de retención. A continuación, las proteínas se identificaron utilizando el motor de búsqueda Mascot v2.1 (Matrix Science). La carbamidometilación de las cisteínas se estableció como modificación fija, y la oxidación de metioninas como modificación variable, seleccionando la tripsina como proteína utilizada en el procesamiento de muestras y permitiendo un margen de error de 2 cortes enzimáticos fallidos. Además, se usaron 10 ppm de tolerancia de masas de péptidos y 0,5 Da de tolerancia de masas de fragmentos. Los espectros generados se buscaron en la base de datos Uniprot/Swissprot versión 2016_02 restringida a *Homo sapiens*. Para estimar la tasa de descubrimientos falsos (FDR) de las muestras y establecer el umbral máximo de este valor, se realizó una búsqueda de prueba en la base de datos. Según los parámetros obtenidos, se decidió establecer el umbral en $FDR < 1\%$ para los péptidos identificados. La cuantificación de proteínas se realizó a partir de la información relativa a los tres péptidos más intensos (cuando los hubiera), y solo las proteínas con un valor de p menor de 0,05 según el test ANOVA, un *fold change* mayor a 1,2 en cualquier dirección y al menos dos péptidos con $FDR < 1\%$ se consideraron alteradas significativamente. La abundancia relativa normalizada de cada

proteína se expresó como su media \pm la desviación estándar (SD). La representación gráfica del nivel de expresión relativa de las proteínas más destacadas por su significación estadística se llevó a cabo con el programa R v.3.6.0 (R Core Team, 2019), haciendo uso de las librerías *ggplot* (Wickham, 2016) y *gridExtra* (Auguie, 2017).

III.1.4.3 Análisis bioinformático de las proteínas diferencialmente expresadas

Las proteínas con expresión diferencial en FM se analizaron con el programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA; Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). Este software permite, además de vincular los cambios en la expresión de proteínas con la alteración de distintas rutas moleculares, predecir el estado de activación/inhibición de otras rutas y proteínas reguladoras asociadas. Asimismo, IPA es capaz de representar gráficamente todas las rutas vinculadas al estudio, indicando el papel dentro de ellas y el estado de expresión de cada proteína detectada. De las herramientas proporcionadas por IPA, se utilizaron : (i) “*Canonical Pathways*”, para el estudio del papel de cada proteína en rutas moleculares específicas; (ii) “*Diseases & Functions*”, para conocer la relación entre la alteración de estas proteínas y procesos fisiológicos y/o patológicos establecidos y (iii) “*Network-building tool*”, para conocer las redes de interacción de las proteínas alteradas y otras ajenas al estudio y la relación de estas redes con múltiples procesos en el organismo. Además, se utilizó el valor Z que infiere el estado de activación de rutas y factores de transcripción relacionados con las proteínas del estudio, valorando la concordancia entre la expresión de estas y lo descrito en la literatura científica.

De forma complementaria, se utilizó la herramienta *Mapper-search & color pathway* de la base de datos KEGG (https://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html; Kanehisa y Goto, 2000), útil para representar de forma esquemática el papel que desempeña cada proteína en una ruta molecular concreta, así como la base de datos PANTHER del *Gene Ontology Consortium* (Mi et al., 2017), herramienta con la que se llevó a cabo el estudio de términos de ontología génica (GO) para proporcionar una descripción general de los genes codificantes de las proteínas implicadas en el estudio.

III.1.5 Validación de las proteínas diferencialmente expresadas en cada grupo experimental

Una vez determinadas las proteínas diferencialmente expresadas en los distintos grupos analizados, se procedió a comprobar algunos resultados del análisis proteómico mediante técnicas alternativas. Concretamente, las dos proteínas con mayor ratio FM/SANAS, haptoglobina y fibrinógeno, se validaron utilizando tests habituales en los laboratorios de diagnóstico. Así, la concentración de haptoglobina se determinó por inmunoturbidimetría, usando la prueba Tina-quant (Roche Diagnostics®) en un analizador MODULAR P de Roche/Hitachi. El fibrinógeno fue confirmado utilizando el reactivo Mutifibren® U (Dade Behring Holdings, Inc.) en un analizador BCS XP (Siemens). Además, para la valoración clínica del parámetro VSG se usaron tubos BD Seditainer™ analizados en un BD Vacutainer® Sedi-15™ (Becton Dickinson).

Para corroborar los niveles de APOL1, ACTB y THBG, 3 proteínas normalizadas tras la intervención nutricional con AOVE, se utilizaron kits ELISA de Cusabio™ (ACTB: CSB-E13298h) y Cloud-Clone Corp.™ (APOL1: SED741Hu; THBG: SEA305Hu), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

III.2 MODELO *IN VITRO*: ESTUDIO EN FIBROBLASTOS DERMALES

La segunda parte de esta tesis doctoral consistió en la realización de un estudio *in vitro* con fibroblastos dermales procedentes de una mujer sana (SANAS) y de una enferma de FM (FM), tratados con HT (FM+HT).

III.2.1 Tratamiento con hidroxitirosol

Para estudiar el efecto del HT sobre los fibroblastos dermales, las células se trataron, en función del experimento, con diferentes concentraciones de HT (1,5, 25, 50, 100, 150, 200 y 300 μM) diluido en etanol absoluto, durante 48 h. Como controles se utilizaron células tratadas con etanol absoluto.

III.2.2 Descripción y mantenimiento de los cultivos primarios

Se utilizaron dos cultivos celulares de fibroblastos dermales primarios procedentes de una persona sana (SANAS) y de una paciente de FM (FM), cedidos por el Dr. Cordero (Instituto

de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix”, Granada, España). Las células se mantuvieron en cámaras incubadoras (CO₂ JOUAN IG 150) a temperatura constante (37 °C) y atmósfera al 5 % de CO₂. El medio de cultivo utilizado fue DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) con concentración elevada de glucosa (4,5 mg/l), suplementado con un 20 % de suero bovino fetal, penicilina (100 U/ml), estreptomina (0,1 µg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml). El uso de este modelo *in vitro* fue informado favorablemente por la Comisión de Ética de la Universidad de Jaén (anexo 4).

III.2.3 Valoración de la citotoxicidad del hidroxitirosol

El efecto citotóxico del HT sobre la proliferación celular se valoró mediante tinción con sulforrodamina-B (Valenzuela et al., 1995). Para ello, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos a una concentración de 40.000 células/pocillo. Tras 24 h, se trataron con HT (25, 50, 100, 150, 200 y 300 µM) durante 48 h. Una vez transcurrida la incubación, se retiró el medio, se lavó el cultivo con tampón fosfato salino y se fijaron las células con ácido tricloroacético al 10 % durante 30 min y a una temperatura de 4 °C. A continuación, los pocillos se lavaron con agua corriente para, posteriormente, y una vez secos, poder teñir las células con sulforrodamina-B (Sigma) disuelta al 0,4 % en ácido acético al 1 %. Pasado el tiempo de tinción (30 min), se lavaron los pocillos con ácido acético al 1 % para eliminar el colorante no unido a la monocapa celular. Finalmente, tras secar las placas, el colorante unido se solubilizó con tampón Tris 10 mM (pH 10,5) y se cuantificó su absorbancia a 492 nm en un lector de placas (ThermoLabSystem Multiscan Ascent).

III.2.4 Determinación del nivel de estrés oxidativo

El nivel basal de estrés oxidativo se determinó mediante la cuantificación de los niveles de ERO intracelulares. Este parámetro se midió por fluorescencia (Wang y Joseph, 1999) utilizando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) que, una vez en el interior de las células, se oxida en presencia de radicales libres (especialmente de peróxido de hidrógeno), generando el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Para este ensayo, las células sanas y procedentes de FM se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 10.000 células/pocillo. Tras 24 h, se retiró el medio y se añadió DCFH-DA 100 µM, disuelta en tampón de Krebs y preparada de forma extemporánea partiendo de un stock 20,5 mM en DMSO. Tras 30 min de incubación, las células se lavaron tres veces con tampón de Krebs. A

continuación, se midió la fluorescencia generada por el compuesto DCF (excitación 485 nm, emisión 535 nm) utilizando un lector de microplacas (Sinergy HT, BioTek).

Este mismo procedimiento se siguió para evaluar el efecto antioxidante del HT. En este caso, los cultivos se trataron previamente con concentraciones variables de HT (0,01, 5, 10, 25, 50, 100 y 200 μM) durante un tiempo de 48 h.

III.2.5 Estudio del perfil proteómico y análisis bioinformático

El estudio en fibroblastos de las diferencias en el proteoma asociadas a la FM (FM vs. SANAS), así como del efecto del tratamiento con HT a concentración de 1,5 μM (FM vs. FM+HT) se llevó a cabo sobre 4 réplicas biológicas de cada cultivo, de forma similar a lo descrito en el epígrafe III.1.4. No obstante, en este caso no se realizó depleción por columna, innecesaria en los extractos proteicos celulares por su menor complejidad. Además, se utilizaron las herramientas de IPA "Tox", que proporciona información sobre la respuesta inducida por el tratamiento con distintos agentes tóxicos, y "Path designer", útil en la edición de los gráficos de rutas. Aunque el criterio considerado para establecer las proteínas diferencialmente expresadas fue similar al empleado en el estudio en plasma, para el análisis bioinformático de proteínas revertidas con HT sólo se consideraron aquellas que en la comparación FM vs. SANAS habían mostrado un *fold change* > 1,5 en cualquier dirección.

III.2.6 Validación de las proteínas diferencialmente expresadas en cada grupo experimental

Tras evaluar las proteínas diferencialmente expresadas en los distintos grupos, se procedió a la validación de algunos resultados del análisis proteómico mediante técnicas alternativas. Como paso previo, se calculó la concentración proteica de los extractos celulares por el método Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina sérica bovina como proteína patrón. Para la validación se utilizaron las técnicas de western blot, con anticuerpos monoclonales específicos para cada proteína (colágeno 1: COL1A1, 1/200, sc-293182; colágeno 6: COL6A1, 1/100, sc-377143; colágeno 12: COL12A1, 1/100, sc-166020; Santa Cruz Biotechnology Inc.), y ELISA (fibronectina 1: FN1, Cusabio™, CSB-E04551h).

Para el western blot, se separaron por electroforesis cantidades conocidas de proteína de las diferentes muestras (15 μg) previamente desnaturalizadas, según lo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 7,5 %

y de 1,5 mm de grosor. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (Immobilon P, Millipore) por transferencia semiseca (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad). Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (leche en polvo desnatada al 3,5 % p/v en Tris-HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 137 mM, KCl 2,6 mM y Tween-20 al 0,1 %) durante 1 h y posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación suave con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo. Una vez terminada la incubación, las membranas se lavaron con tampón de lavado (leche desnatada en polvo al 1,5 % p/v en Tris-HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 137 mM, KCl 2,6 mM y Tween 20 al 0,05 %) 3 veces durante 5 min en agitación a Tª ambiente. A continuación, las membranas se incubaron 1 h a Tª ambiente con el anticuerpo secundario (1/5000, anti-mouse A0168, Sigma). Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las membranas 3 veces con tampón de lavado y el complejo antígeno-anticuerpo se detectó mediante revelado por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL™ Plus (Amersham Corp.). Como control de carga, se realizó la inmunodetección de la α -tubulina con un anticuerpo monoclonal (1/16.000, T5168, Sigma-Aldrich). La cuantificación densitométrica de las autorradiografías se llevó a cabo con el programa TotalLab (v1.11).

La confirmación de la reversión tras tratamiento con HT de las proteínas cofilina (CFL1) y catenina beta (CTNNB1), se realizó con kits de ELISA comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (CFL1: Cloud-Clone Corp.™, SEB559Hu; CTNNB1: Cloud-Clone Corp.™, SEB021Hu).

III.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se han expresado como el valor medio de la muestra \pm desviación estándar (SD) de, al menos, tres valores independientes. En todos los supuestos, durante el contraste de hipótesis entre grupos, se ha considerado hipótesis nula (H_0) la ausencia de diferencias entre los grupos comparados, estableciendo la significación estadística para poder rechazar dicha hipótesis en 0,05 (error de tipo I, $\alpha = 0,05$). Por tanto, siempre que en los test estadísticos aplicados el valor p resultara menor que el error de tipo I ($p < 0,05$), se rechazó H_0 , es decir, se asumió que existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados.

Para conocer la distribución de los datos, estos se analizaron mediante el test de Kolmogorov-Smirnov antes de cada análisis comparado, comprobando así si los datos seguían una distribución normal. En caso afirmativo, y si la comparativa a realizar era de un grupo frente a otro, la diferencia entre las medias de los grupos comparados se realizó mediante el test paramétrico *t* de *Student* para medidas desapareadas. Por el contrario, si los datos no seguían una distribución normal, estas diferencias se valoraron con el test no paramétrico *U* de *Mann-Whitney*. La comparación entre múltiples grupos se hizo con los tests estadísticos ANOVA de un factor (si los grupos siguieran una distribución normal) o Kruskal Wallis (en caso contrario). Si las diferencias resultaban estadísticamente significativas, se utilizaron los test *post-hoc* Tukey, Dunn o Dunnet, en función de las comparativas realizadas.

Por su parte, cuando se pretendía evaluar la correlación entre variables, se aplicaron los test de *Pearson* (si los datos procedían de una distribución normal) o de *Spearman* (si los datos procedían de una distribución diferente a la normal). En caso de la comparación de variables categóricas nominales (como ocurre, por ejemplo, en los estadísticos relativos a los términos GO) el test estadístico elegido para contrastar hipótesis fue el test Exacto de Fischer.

Por último, para determinar la posible capacidad diagnóstica de marcadores de FM se elaboraron curvas Características Operativas del Receptor (ROC). Este es un método estadístico extensamente utilizado para determinar la exactitud diagnóstica de un test. Con el objetivo de evaluar la capacidad discriminativa entre grupos de cada marcador en concreto, se utilizó el valor del Área Bajo la Curva (AUC). Esta capacidad se considera mayor cuanto más se acerque este valor a 1 (Akobeng, 2007). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism® 6.01.

IV.RESULTADOS

IV.1 DIFERENCIAS EN EL PROTEOMA PLASMÁTICO DE PACIENTES DE FIBROMIALGIA Y EFECTO DEL CONSUMO DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

IV.1.1 Diferencias asociadas a la fibromialgia en el proteoma plasmático

El plasma es un tejido de fácil extracción y gran información biológica. Para establecer las diferencias moleculares asociadas a la FM en este tejido se abordó el estudio proteómico comparado del plasma de mujeres sanas y pacientes de FM (**objetivo 1**).

IV.1.1.1 Datos clínicos y demográficos de las participantes en el estudio

Los datos clínicos y demográficos de las participantes en el estudio (SANAS y FM) se recogen en la tabla 3. El valor medio del cuestionario FIQ de las pacientes superó los 50 puntos, indicando la severa afectación de su capacidad funcional. Asimismo, la valoración del dolor realizada mediante EVA fue superior a 5, punto medio de dolor percibido. Al comparar la puntuación del cuestionario de salud SF-12 de ambos grupos, se observó que las pacientes de FM tienen una percepción de su estado de salud significativamente peor, tanto a nivel físico (PCS-12, $p < 0,05$) como mental (MCS, $p < 0,001$).

Variable	SANAS (n = 12)	FM (n= 12)	valor de p
Edad (años)	47,58 ± 7,94	50,58 ± 6,27	> 0,05
Puntuación FIQ	-	52,38 ± 17,07	-
Puntuación EVA	-	5,62 ± 2,83	-
Puntuación PCS-12	55,08 ± 2,52	33,53 ± 9,16	< 0,001***
Puntuación MCS-12	50,48 ± 5,75	38,53 ± 13,99	< 0,05*

Tabla 3. Datos clínicos y demográficos de las personas sanas y las pacientes de FM. Diferencias estadísticamente significativas respecto a mujeres sanas: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

IV.1.1.2 Análisis comparado del perfil proteómico del plasma

En el análisis proteómico de las muestras de plasma se identificaron un total de 266 proteínas, de las cuales 33 se hallaron diferencialmente expresadas atendiendo a su abundancia relativa: 25 elevadas (FM/SANAS > 1,2; FDR < 1 %; $p < 0,05$) y 8 reducidas (FM/SANAS < 0,8; FDR < 1 %; $p < 0,05$; Tabla 4).

ID en Uniprot	Nombre de la proteína	Abreviatura	Nombre del gen	Ratio (FM/SANAS)	valor de <i>p</i>
P00738	Haptoglobina	HPT	HP	2,54	7,95E-05
P02679	Fibrinógeno (cadena gamma)	FIBG	FGG	2,30	5,49E-03
P60709	Actina citoplasmática 1	ACTB	ACTB	2,26	1,11E-03
P07996	Trombospondina-1	TSP1	THBS1	2,21	3,33E-02
O14791	Apolipoproteína L1	APOL1	APOL1	1,91	3,77E-04
P35542	Proteína A-4 sérica amiloide	SAA4	SAA4	1,89	3,43E-03
P02655	Apolipoproteína C2	APOC2	APOC2	1,83	1,15E-02
P02787	Transferrina sérica	TRFE	TF	1,83	1,30E-03
P02675	Fibrinógeno (cadena beta)	FIBB	FGB	1,78	4,38E-02
P20742	Pregnancy zone protein	PZP	PZP	1,76	4,05E-03
P19652	Alfa-1-glicoproteína ácida 2	A1AG2	ORM2	1,74	4,58E-03
P01876	Ig alfa-1 (región C de la cadena)	IGHA1	IGHA1	1,74	3,09E-02
P00742	Factor X de la coagulación	FA10	F10	1,63	9,92E-03
P02763	Alfa-1-glicoproteína ácida 1	A1AG1	ORM1	1,58	2,27E-02
P01023	Alfa-2-macroglobulina	A2M	A2M	1,52	1,20E-02
P01871	Ig mu (región C de la cadena)	IGHM	IGHM	1,52	2,24E-02
P09871	Subcomponente C1s del complemento	C1S	C1S	1,49	1,23E-04
P02743	Componente P sérico amiloide	SAMP	APCS	1,48	2,44E-02
P08603	Factor H del complemento	CFAH	CFH	1,43	4,20E-03
P10643	Componente C7 del complemento	CO7	C7	1,39	9,26E-03
P06681	Complemento C2	CO2	C2	1,38	9,72E-03
P07225	Proteína S dependiente de vitamina K	PROS	PROS1	1,38	1,06E-02
P00740	Factor IX de la coagulación	FA9	F9	1,36	7,09E-03
P02747	Subunidad C del Subcomponente C1q del complemento	C1QC	C1QC	1,35	1,55E-02
P02748	Componente C9 del complemento	CO9	C9	1,33	7,31E-03

ID en Uniprot	Nombre de la proteína	Abreviatura	Nombre del gen	Ratio (FM/SANAS)	valor de p
P01019	Angiotensinógeno	ANGT	AGT	0,73	3,98E-02
P04196	Glucoproteína rica en histidina	HRG	HRG	0,70	2,90E-02
P08571	Antígeno de diferenciación de monocitos CD14	CD14	CD14	0,67	5,95E-03
P08185	Globulina fijadora de corticosteroides	CBG	SERPINA6	0,66	2,78E-02
P05543	Globulina fijadora de tiroxina	THBG	SERPINA7	0,63	5,93E-03
Q9UK55	Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z	ZPI	SERPINA10	0,63	1,29E-02
Q9UGM5	Fetuína-B	FETUB	FETUB	0,53	3,75E-03
P00915	Anhidrasa carbónica 1	CA1	CA1	0,47	4,06E-03

Tabla 4. Proteínas con expresión diferencial en FM, ordenadas según su ratio FM/SANAS.

Los valores individuales de las 3 proteínas con mayor significación estadística ($p < 0,001$) se representan en la figura 13.

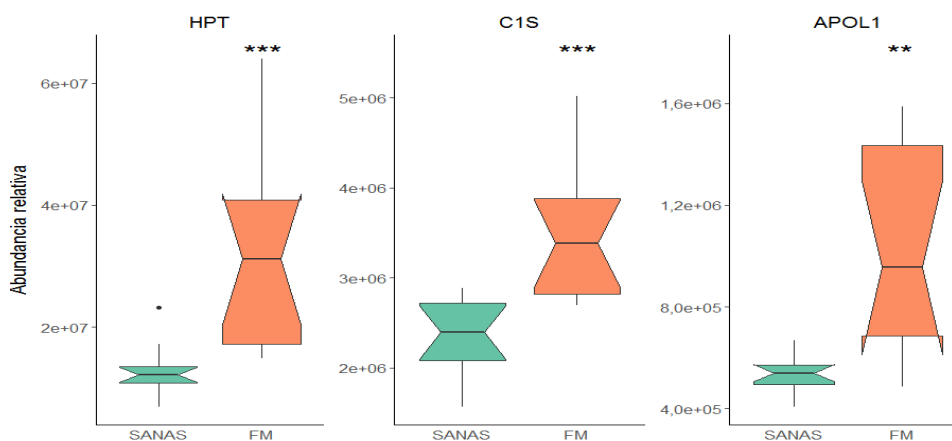


Figura 13. Gráfico de cajas y bigotes de la abundancia relativa de haptoglobina (HPT), subcomponente C1 del complemento (C1S) y Apolipoproteína L1 (APOL1) en mujeres sanas y enfermas de FM. Diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores en mujeres sanas: ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

IV.1.1.3 Análisis bioinformático de las proteínas diferencialmente expresadas

Una vez establecidas las proteínas diferencialmente expresadas en el proteoma plasmático de las pacientes de FM, se procedió a su análisis con el programa IPA y la base de datos KEGG.

IV.1.1.3.1 Análisis IPA

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis con IPA que permite, entre otros aspectos, establecer las rutas moleculares que se modifican como consecuencia de la expresión diferencial de proteínas en FM. De este modo, el programa detectó una variación estadísticamente significativa en 25 rutas (fig. 14).

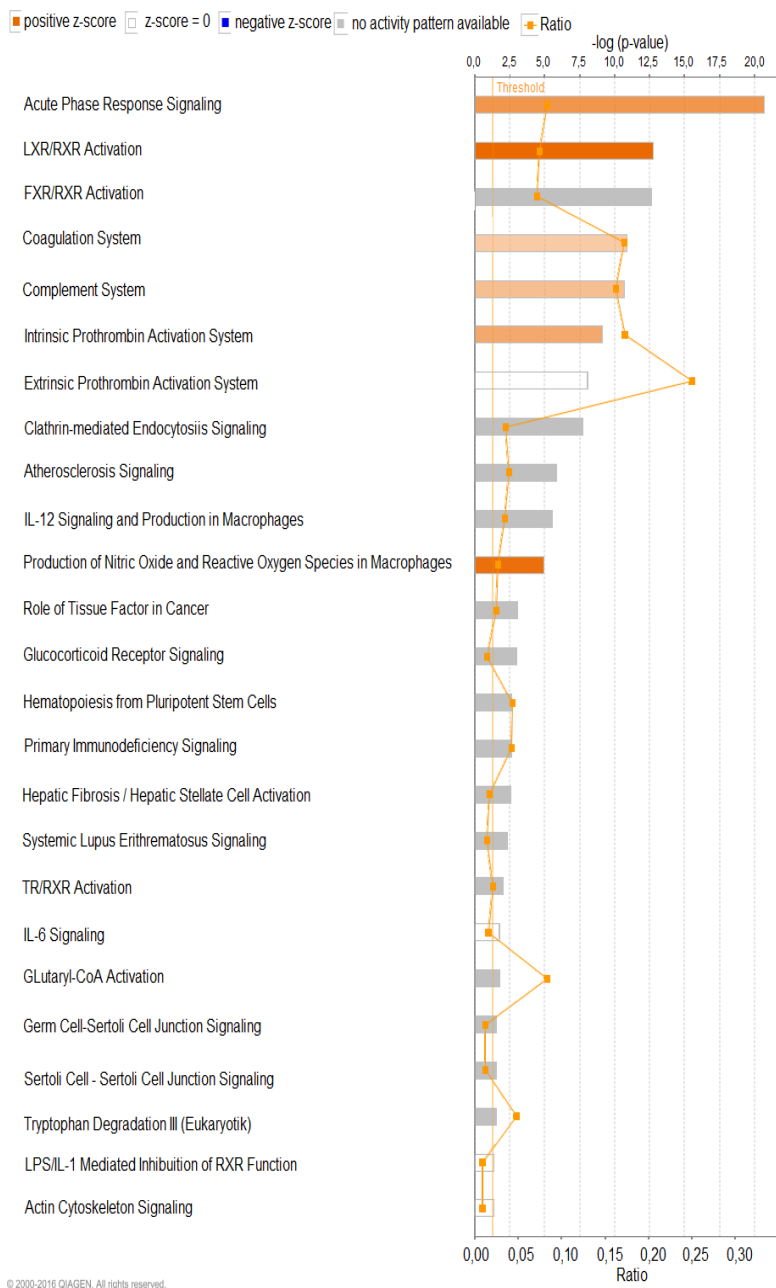


Figura 14. Gráfico de barras en IPA de las 25 rutas moleculares (*Canonical pathways*) alteradas en las pacientes de FM. En color naranja, las rutas con estadístico Z positivo.

Las proteínas que provocan la alteración de las 5 rutas con mayor significación estadística se recogen en la tabla 5:

Ruta molecular afectada	Nº de proteínas implicadas	Abreviatura de las proteínas implicadas
Señalización de la respuesta de fase aguda	14	A1AG1, A1AG2, A2M, ANGT, C1S, CO2, CO9, FIBB, FIBG, HPT, HRG, SAA4, SAMP, TRFE
Activación de LXR/RXR	9	A1AG1, A1AG2, ANGT, APOC2, APOL1, CD14, CO9, SAA4, TRFE
Activación de FXR/RXR	9	A1AG1, A1AG2, ANGT, APOC2, APOL1, CO9, FETUB, SAA4, TRFE
Sistema de la coagulación	6	A2M, FA9, FA10, FIBB, FIBG, PROS
Sistema del complemento	6	C1QC, C1S, CFAH, CO2, CO7, CO9

Tabla 5. Rutas moleculares alteradas en FM con mayor significación estadística y proteínas implicadas.

Además, se elaboraron diagramas de Venn con el objetivo de representar gráficamente el número de proteínas comunes entre las rutas más interrelacionadas (Respuesta de fase aguda – Activación de LXR/RXR – Activación de FXR/RXR; Respuesta de fase aguda – Sistema de la Coagulación – Sistema del complemento; fig. 15).

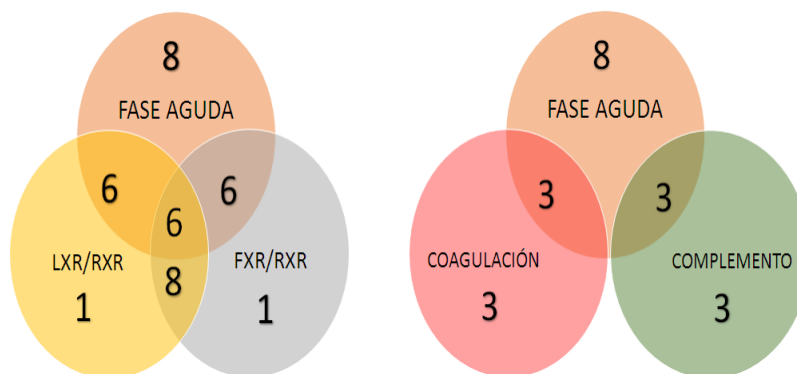


Figura 15. Diagramas de Venn representativos del número de proteínas exclusivas y comunes entre rutas moleculares.

Atendiendo al valor Z, las rutas de mayor significación fueron “Producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno en macrófagos” y “Activación de LXR/RXR” (Z = 2,33 y Z = 2,34, respectivamente).

Otra herramienta de gran utilidad dentro del software IPA es de “Disease & Function”, que permite valorar la relación entre las proteínas diferencialmente expresadas y distintas alteraciones fisiológicas. De este modo, se confirmó el papel activador que tenían sobre la ruta de la coagulación algunas de las proteínas alteradas en pacientes de FM, así como la inhibición de la ruta implicada en el sangrado (fig. 16).

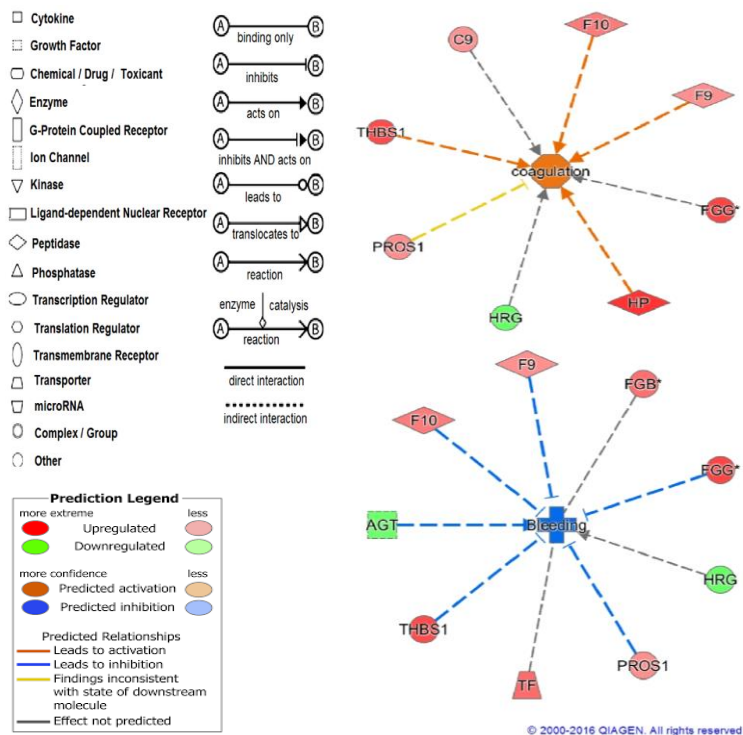
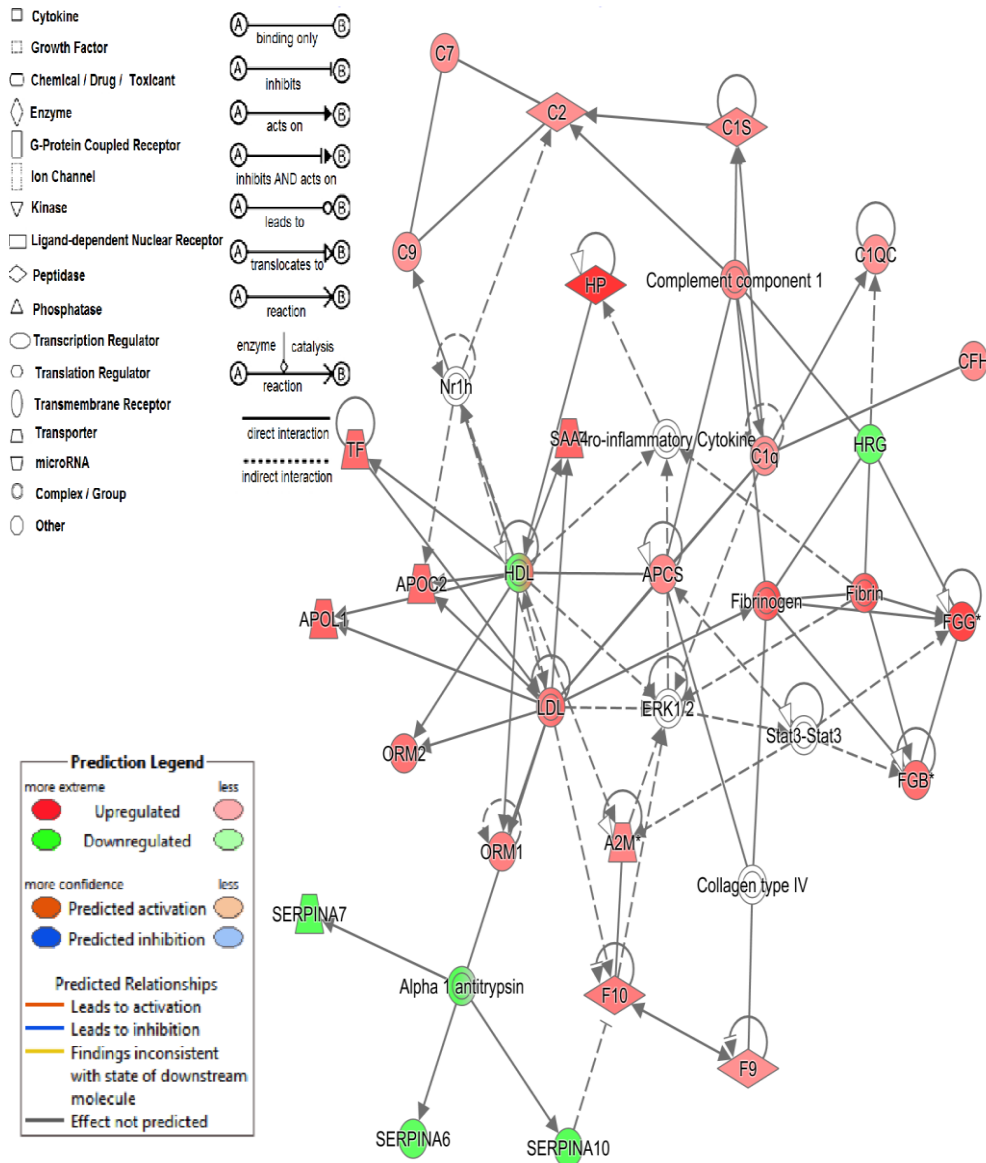


Figura 16. Gráfico representativo de las rutas moleculares de la Coagulación y el Sangrado y su relación con las proteínas alteradas en FM. En rojo, las proteínas elevadas y en verde, las proteínas con expresión reducida en FM.

Por otro lado, la herramienta “Networks” de IPA es útil para la construcción de redes moleculares. Estas redes se componen de proteínas contenidas en el perfil proteómico introducido y de otras ajenas a este pero que interactúan con ellas. Así, IPA generó la red molecular de la figura 17, integrada por 23 de las 33 proteínas diferencialmente expresadas en FM, que el programa relacionó con “Alteraciones del desarrollo, alteraciones hereditarias y enfermedades inmunológicas”.



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 17. Representación esquemática en IPA de la red “Alteraciones del desarrollo, alteraciones hereditarias y enfermedades inmunológicas”. En rojo, las proteínas elevadas y en verde, las proteínas con expresión reducida en FM.

IV.1.1.3.2 Análisis KEGG

Con el objeto de representar de una forma más sencilla el papel de las proteínas alteradas en FM se hizo uso de la base de datos KEGG. Concretamente, se utilizó la herramienta KEGG “Mapper – Search & Color Pathway”. En esta base de datos, las rutas del Complemento y la Coagulación fueron las más afectadas en las pacientes de FM, con un total de 11 proteínas alteradas. Estas proteínas formaban parte de la vía clásica del complemento (C1S, C07, C02, C1QC, C09) y de la vía intrínseca de la coagulación (FA9, FA10, FIBB, FIBG). Además, la red molecular generada permitió comprobar el papel inhibitorio de CFAH y A2M,

ambas con expresión elevada en FM, sobre la vía alternativa del complemento y la fibrinolisis, respectivamente (fig. 18).

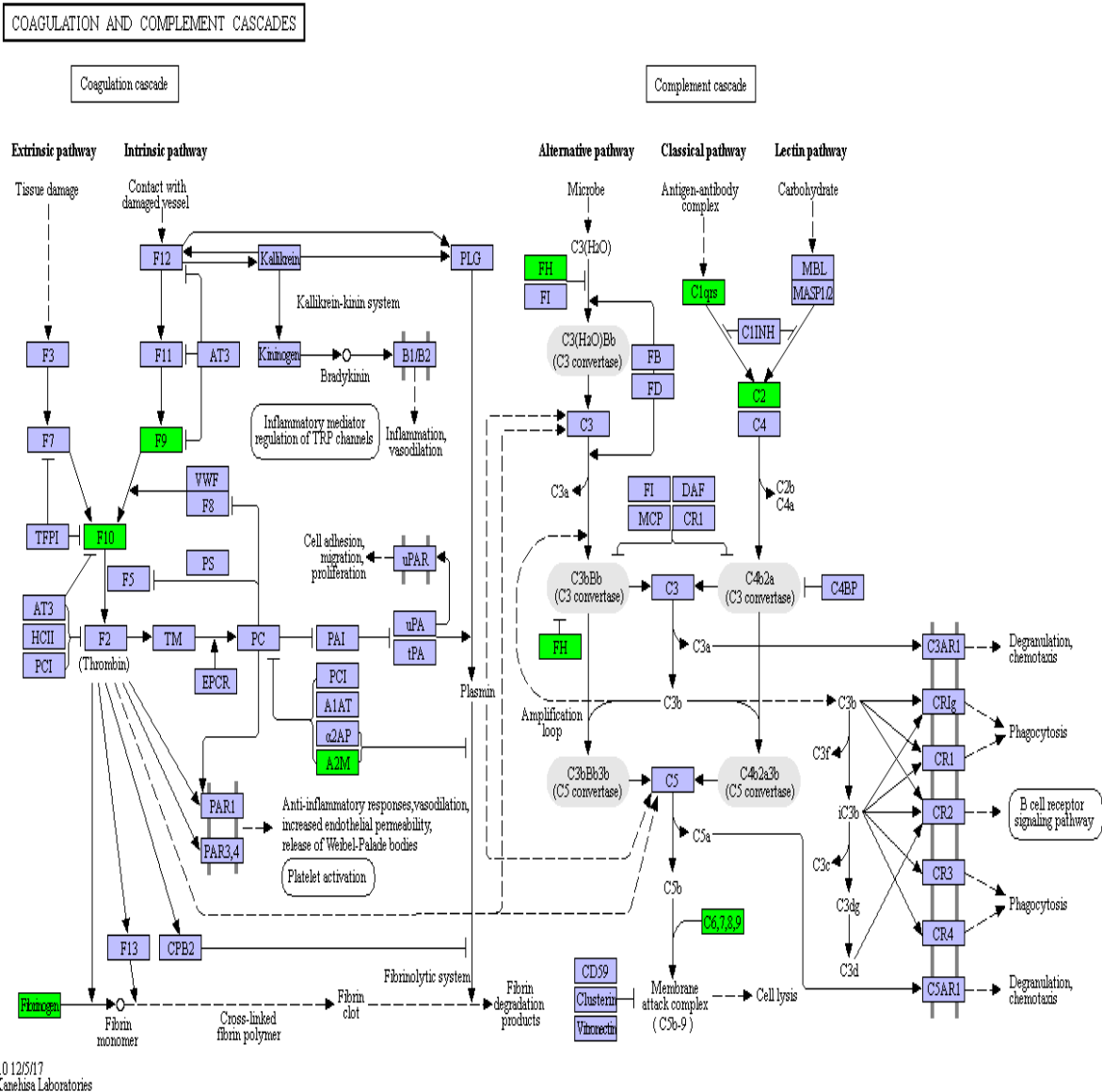


Figura 18. Rutas de la coagulación y el complemento. En verde, las proteínas con expresión diferencial en FM, todas ellas elevadas.

IV.1.1.4 Validaciones de los resultados de proteómica

Con el objeto de comprobar la alteración de las dos proteínas con mayor expresión diferencial (HPT y FIBG) que, además, estaban estrechamente relacionadas con las dos rutas de mayor relevancia encontradas (fase aguda y coagulación), se llevó a cabo una determinación de la concentración de ambas mediante técnicas alternativas a la proteómica. Esta validación, realizada con tests habituales en los laboratorios de diagnóstico, confirmó la elevación de estas proteínas en FM (tabla 6). Además, por su relación directa con la fase aguda

y la coagulación, también se determinó la VSG en mujeres sanas y enfermas de FM, parámetro que resultó ser mayor en estas últimas (tabla 6).

Variable	SANAS (n = 12)	FM (n = 12)	valor de p
Haptoglobina (mg/dl)	100,55 ± 22,41	154,86 ± 62,26	< 0,05*
Fibrinógeno (g/l)	2,77 ± 0,41	3,43 ± 0,78	< 0,01**
VSG (mm)	7,86 ± 3,34	20,33 ± 9,17	< 0,01**

Tabla 6. Valores, representados como su media ± SD, de las determinaciones clínicas efectuadas. Diferencias estadísticamente significativas respecto a mujeres sanas: * p < 0,05; **p < 0,01.

Los resultados de la correlación entre los parámetros clínicos y proteómicos relacionados con la coagulación y la inflamación se recogen en la tabla 7. En todos los casos, esta correlación fue positiva, confirmando la conexión existente entre ambas rutas.

		Clínica			Proteómica		
		Haptoglobina (mg/dl)	Fibrinógeno (g/L)	VSG (mm)	HPT	FIBB	FIBG
Clínica	Haptoglobina (mg/dl)	1	0,648	0,667	0,755	0,506	0,548
	Fibrinógeno (g/L)		1	0,791	0,720	0,568	0,582
	VSG (mm)			1	0,729	0,484	0,504
Proteómica	HPT				1	0,668	0,670
	FIBB					1	0,932
	FIBG						1

Tabla 7. Coeficientes de correlación entre las determinaciones clínicas y proteómicas.

IV.1.1.5 Utilidad diagnóstica de las proteínas diferencialmente expresadas

Una vez identificadas las proteínas con expresión diferencial en las pacientes de FM, se elaboraron curvas de rendimiento diagnóstico (curvas ROC) con el objetivo de identificar aquellas que pudieran ser útiles como biomarcadores de esta patología. De las 33 proteínas, en 4 (ACTB, FIBG, SAA4, TRFE) se obtuvo un valor de AUC mayor que 0,85 (p < 0,01). Concretamente, en 2 proteínas (C1S y HPT) incluso se superó el valor de AUC de 0,90 (0,92 y 0,94 respectivamente; p < 0,001; fig. 19).

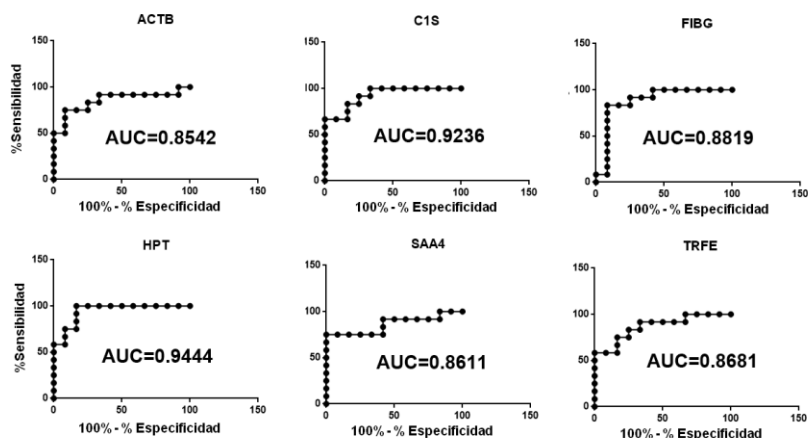


Figura 19. Curvas ROC de las 6 proteínas con un valor de AUC superior a 0,85.

IV.1.2 Efecto del consumo de una dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra en el proteoma plasmático de pacientes de fibromialgia

Tras confirmar la implicación de rutas moleculares relacionadas con la respuesta de fase aguda, la inflamación, el sistema inmune y el metabolismo lipídico en FM, y considerando las propiedades beneficiosas que el AOVE tiene sobre estas, se procedió al estudio del efecto del consumo de una dieta enriquecida con este aceite (**objetivo 2**).

IV.1.2.1 Datos clínicos y demográficos de las participantes en el estudio

Los datos clínicos y demográficos de las pacientes de FM, que consumieron (FMA) o no (FM) AOVE, se muestran en la tabla 8.

Variable	FM (n= 12)	FMA (n = 11)	valor de p
Edad (años)	50,58 ± 6,27	55,45 ± 6,93	> 0,05
Puntuación FIQ	52,38 ± 17,07	50,43 ± 18,47	> 0,05
Puntuación EVA	5,62 ± 2,83	5,35 ± 1,64	> 0,05
Puntuación PCS-12	33,53 ± 9,16	34,32 ± 6,23	> 0,05
Puntuación MCS-12	38,53 ± 13,99	36,19 ± 9,74	> 0,05

Tabla 8. Datos clínicos y demográficos de pacientes de FM con y sin intervención nutricional.

IV.1.2.2 Análisis comparado del perfil proteómico del plasma

Tras la intervención nutricional se procedió a analizar el impacto del AOVE sobre el proteoma plasmático, utilizando el grupo FMA como control. Así, y siguiendo los mismos criterios estadísticos que en el estudio proteómico anterior (ratio FM/FMA > 1,2 o < 0,8; valor de $p < 0,5$ y un mínimo de 2 péptidos con FDR < 1 %), se pudieron identificar 20 proteínas con diferente abundancia relativa entre grupos (FM vs. FMA; tabla 9). De estas proteínas, 11 aumentaron su expresión en FM con el consumo del AOVE, haciendo que la ratio FM/FMA disminuyera (FM/FMA < 0,8), y 9 la disminuyeron (FM/FMA > 1,2).

ID en Uniprot	Nombre de la proteína	Abreviatura	Nombre del gen	Ratio (FM/FMA)	valor de p
P02751	Fibronectina	FINC	FN1	6,95	7,39E-03
P02679	Fibrinógeno (cadena gamma)	FIBG	FGG	2,69	3,86E-03
P17936	Proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina	IBP3	IGFBP3	2,56	3,92E-02
P60709	Actina citoplasmática 1	ACTB	ACTB	2,05	8,03E-03
P02655	Apolipoproteína C2	APOC2	APOC2	1,98	6,16E-03
P36980	Proteína relacionada con el Factor H del complemento	FHR2	CFHR2	1,80	1,66E-02
P35542	Proteína A-4 sérica amiloide	SAA4	SAA4	1,73	1,35E-02
O14791	Apolipoproteína L1	APOL1	APOL1	1,62	1,47E-02
P07357	Complemento C8 (cadena alfa)	CO8A	C8A	1,21	4,22E-02
P01011	Alfa-1-antiquimiotripsina	AACT	SERPINA3	0,78	2,27E-02
P43251	Biotinidasa	BTD	BTD	0,71	3,53E-02
P04003	Proteína de unión al complemento C4b (cadena alfa)	C4BPA	C4BPA	0,71	2,02E-02
P08185	Globulina fijadora de corticosteroides	CBG	SERPINA6	0,67	2,53E-02

ID en Uniprot	Nombre de la proteína	Abreviatura	Nombre del gen	Ratio (FM/FMA)	valor de <i>p</i>
P01857	Inmunoglobulina gamma-1 (región C de la cadena)	IGHG1	IGHG1	0,66	3,32E-02
Q9UGM5	Fetuína	FETUB	FETUB	0,63	1,61E-02
P02790	Hemopexina	HEMO	HPX	0,62	3,36E-04
P20851	Proteína de unión al complemento C4b (cadena beta)	C4BPB	C4BPB	0,61	8,23E-03
P05543	Globulina fijadora de tiroxina	THBG	SERPINA7	0,54	2,79E-03
P25311	Glucoproteína-zinc-alfa-2	ZA2G	AZGP1	0,44	7,43E-06
Q15848	Adiponectina	ADIPO	ADIPOQ	0,30	1,03E-02

Tabla 9. Proteínas con expresión diferencial en pacientes de FM con y sin intervención nutricional, ordenadas según su ratio FM/FMA.

Los valores individuales de las 3 proteínas con mayor significación estadística se representan en la figura 20.

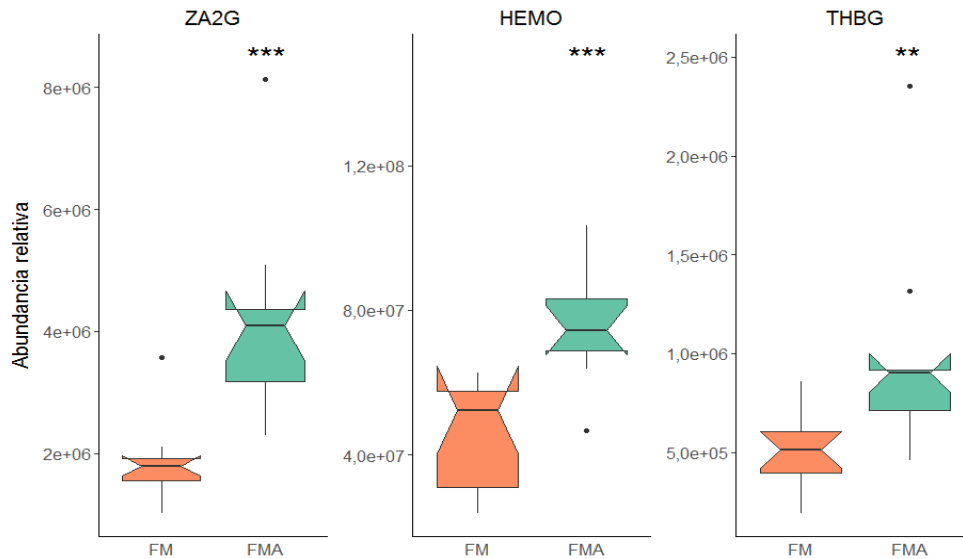


Figura 20. Gráfico de cajas y bigotes de la abundancia relativa de Glucoproteína-Zinc-alfa-2 (ZA2G), Hemopexina (HEMO) y Globulina fijadora de tiroxina (THBG) en enfermas de FM con (FMA) y sin (FM) intervención nutricional. Diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

IV.1.2.3 Análisis bioinformático de las proteínas diferencialmente expresadas

Al igual que se hizo en el estudio previo, las proteínas que mostraron diferencias estadísticamente significativas, se analizaron con el programa IPA y con la base de datos KEGG.

IV.1.2.3.1 Análisis IPA

Utilizando la herramienta IPA se detectaron 26 rutas moleculares que se modificaban tras el consumo de AOVE (fig. 21).

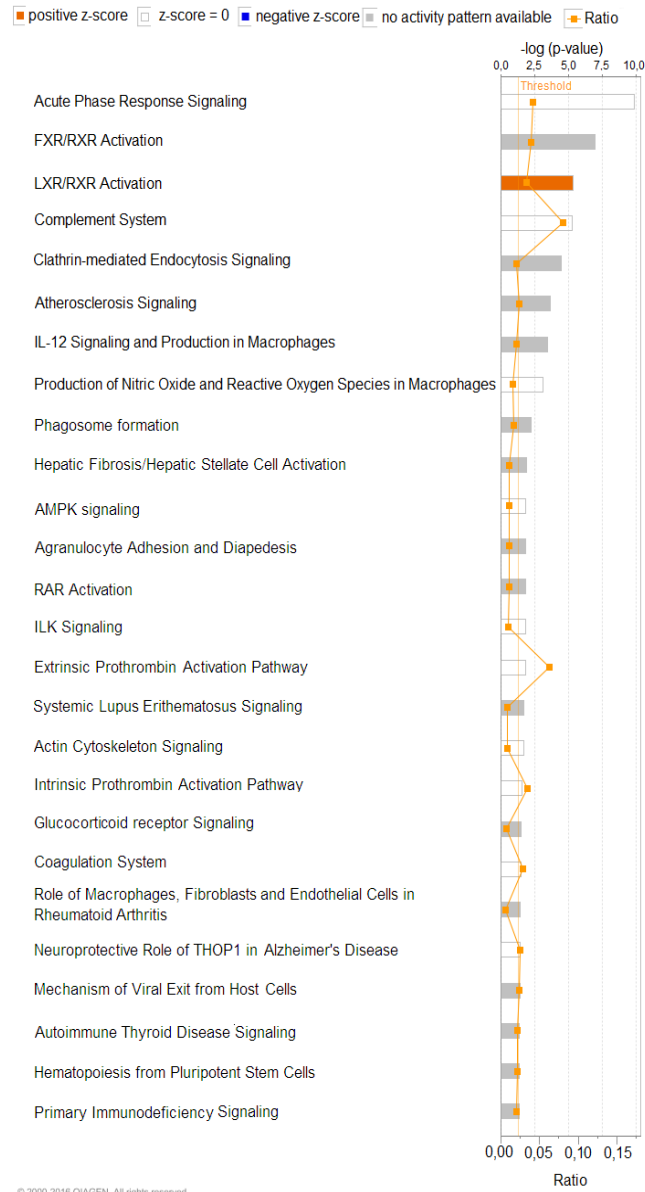


Figura 21. Gráfico de barras de IPA con las 26 rutas moleculares que se modifican con AOVE. En color naranja, las rutas con estadístico Z positivo.

Comparando este análisis con el de pacientes de FM y mujeres sanas (figura 14), se observa que 4 de las 5 rutas más significativamente afectadas por el consumo de AOVE son también las más modificadas por la patología. Las proteínas con expresión diferencial causantes de la modificación de estas rutas se muestran en la tabla 10.

Ruta molecular afectada	Nº de proteínas implicadas	Abreviatura de las proteínas
Señalización de la respuesta de fase aguda	7	AACT, C4BPA, C4BPB, FIBG, FINC, HEMO, SAA4
Activación de LXR/RXR	5	APOC2, APOL1, FETUB, HEMO, SAA4
Activación de FXR/RXR	4	APOC2, APOL1, HEMO, SAA4
Sistema del complemento	3	CO8A, C4BPA, C4BPB
Señalización de endocitosis mediada por clatrina	4	ACTB, APOC2, APOL1, SAA4

Tabla 10. Rutas modificadas por el AOVE con mayor significación estadística y proteínas responsables.

A continuación, se utilizó la herramienta “Disease & Function” de IPA, que destacó los procesos inflamatorios con un total de 6 proteínas (fig. 22).

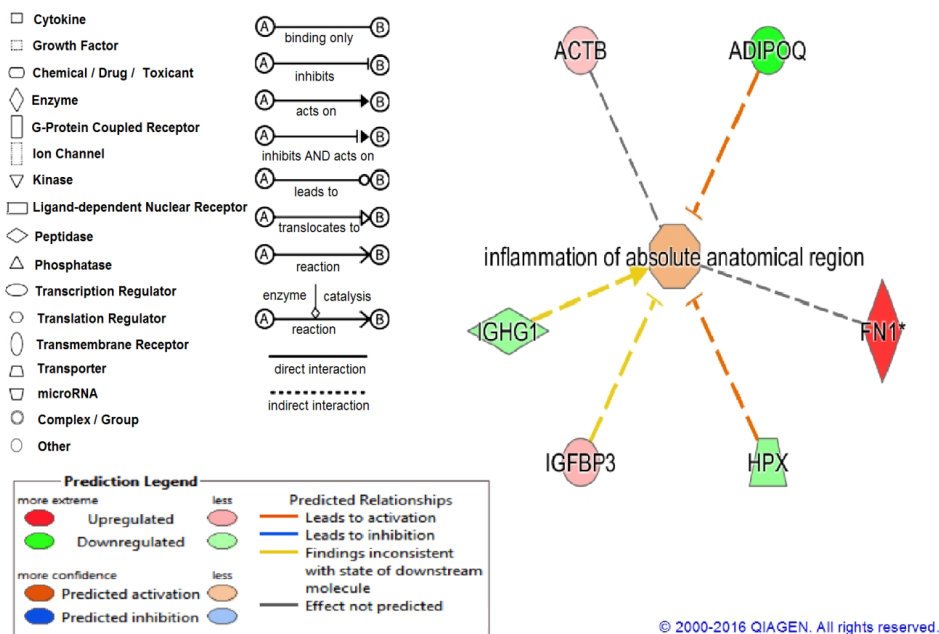
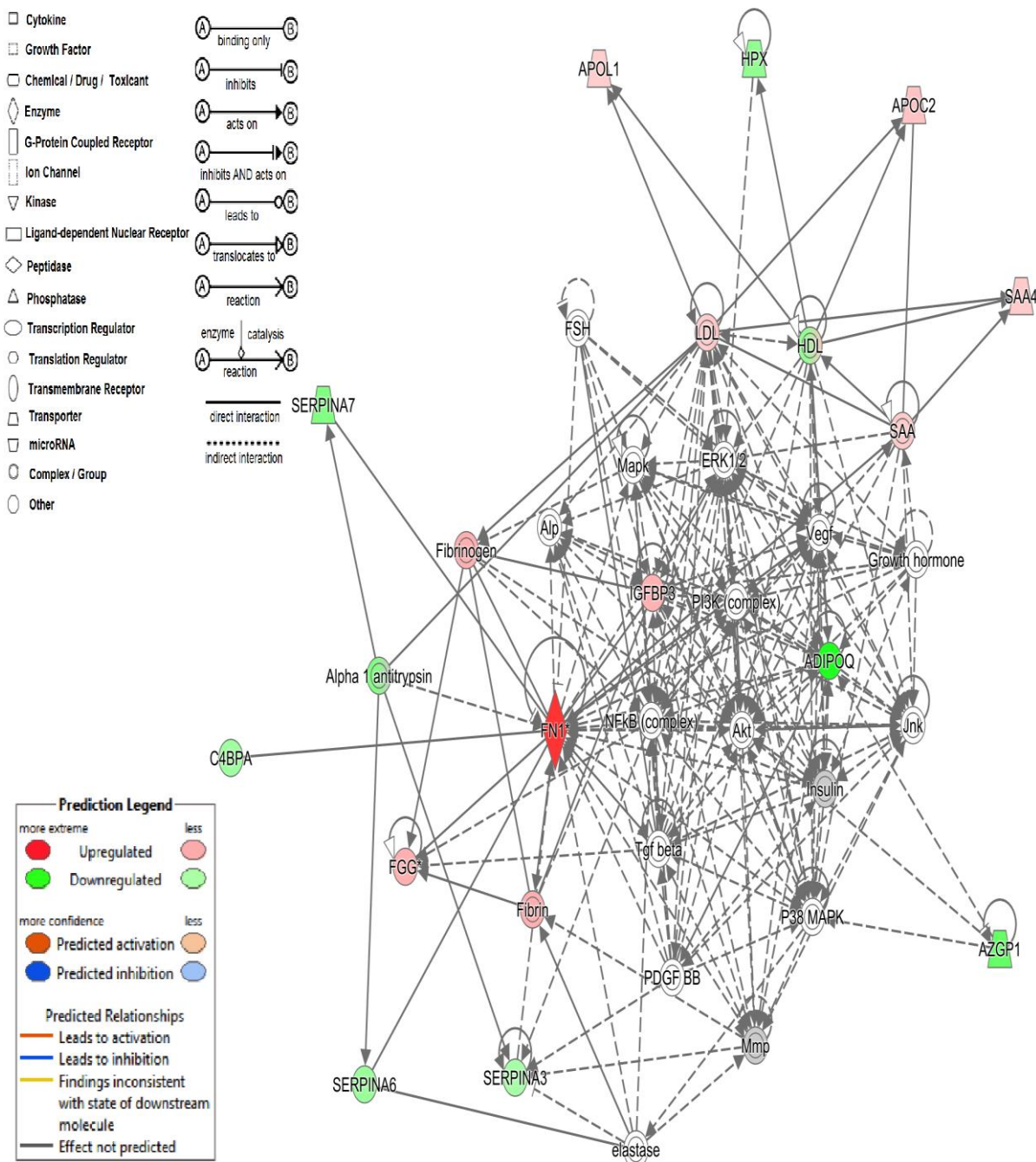


Figura 22. Gráfico *Diseases&Function* representativo de la ruta de Inflamación. En rojo, las proteínas disminuidas por el consumo de AOVE y en verde las aumentadas.

Por último, la red molecular construida con la herramienta *Networks* de IPA estaba conformada por 13 de las 20 proteínas diferencialmente expresadas como consecuencia del consumo de AOVE en las pacientes de FM. Esta ruta se vinculó con la red “Señalización e interacción célula-célula, el desarrollo y la función del sistema hematológico y el tráfico de células inmunes” (fig. 23).



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 23. Representación esquemática en IPA de la red “Señalización e interacción célula-célula, desarrollo y función del Sistema Hematológico y tráfico de células inmunes”, con 13 proteínas diferencialmente expresadas por el AOVE. En rojo, las proteínas disminuidas por el consumo de AOVE y en verde las aumentadas.

IV.1.2.4 Proteínas normalizadas por el consumo de aceite de oliva virgen extra

Entre las 20 proteínas afectadas por la intervención nutricional con AOVE en pacientes de FM, resultó llamativo que tras la intervención nutricional 7 de ellas (ACTB, APOC2, APOL1, CBG, FIBG, SAA4, THBG; figura 25) mostraban niveles de expresión similares a los de mujeres sanas.

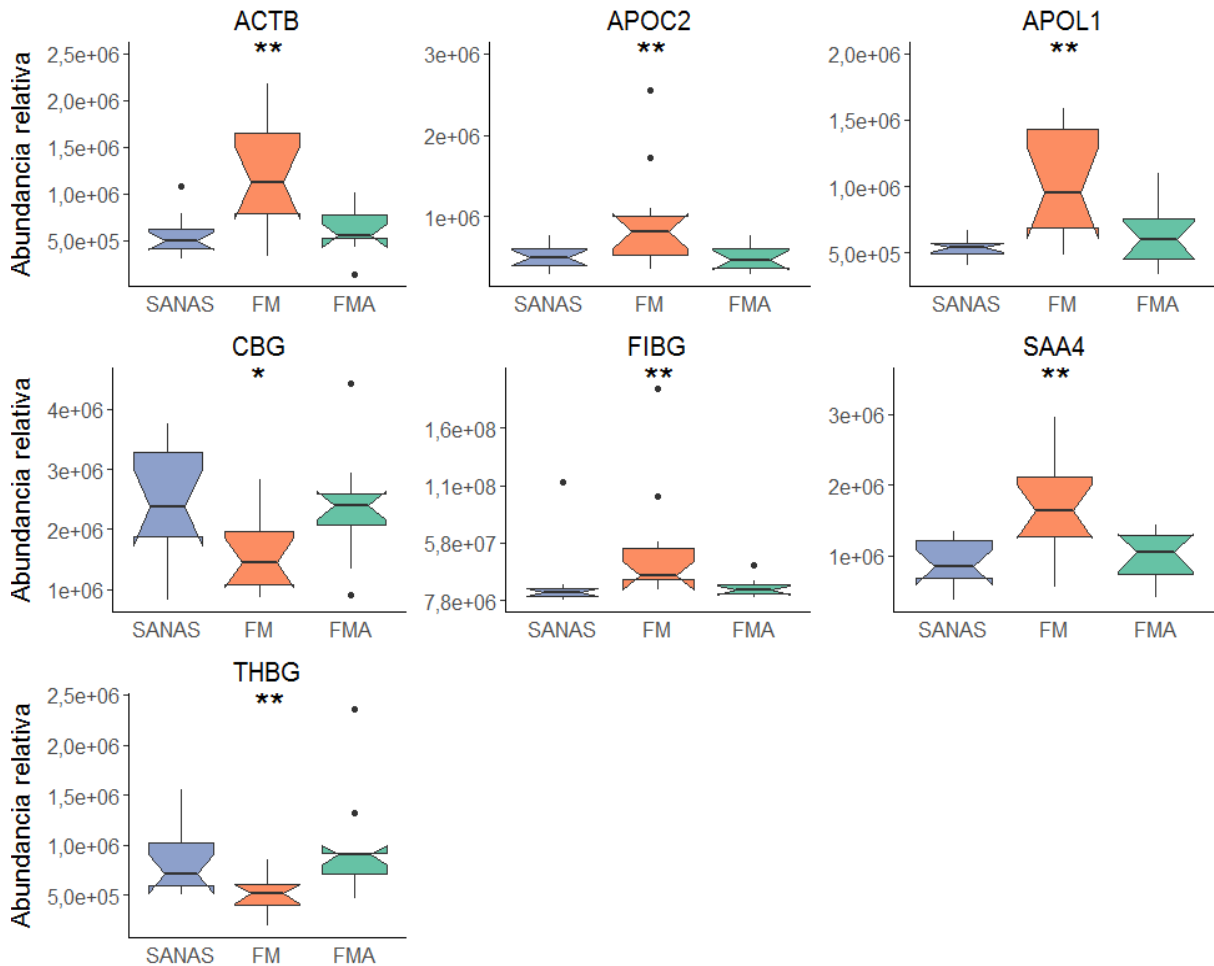


Figura 25. Abundancia relativa de las 7 proteínas que respondieron a la intervención nutricional con AOVE. Diferencias estadísticamente significativas respecto a SANAS: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

IV.1.2.5 Validaciones de los resultados de proteómica

Con el objetivo de corroborar los resultados sobre los que la dieta con AOVE tuvo mayor impacto, se utilizaron: la técnica ELISA, para determinar la expresión proteica de ACTB, APOL1 y THBG, y el test clínico de referencia para evaluar el fibrinógeno y la VSG. Los valores medios obtenidos en estas determinaciones se recogen en la tabla 11.

	SANAS (n = 12)	FM (n = 12)	FMA (n = 11)	valor de p
ACTB (ng/ml)	0,12 ± 0,09	0,17 ± 0,12	0,16 ± 0,12	> 0,05
APOL1 (ng/ml)	571,84 ± 97,85	471,61 ± 89,37	315,80 ± 94,67	< 0,001***
THBG (ng/ml)	2819,78 ± 866,33	2225,55 ± 491,33	2510,99 ± 431,87	> 0,05
Fibrinógeno (ng/ml)	2,77 ± 0,41	3,43 ± 0,78	3,40 ± 0,54	< 0,05*
VSG (mm)	7,86 ± 3,34	20,33 ± 9,17	12,91 ± 7,04	< 0,01**

Tabla 11. Medias ± SD de las proteínas analizadas y de VSG. Diferencias estadísticamente significativas respecto a SANAS: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

En la validación por ELISA sólo los valores obtenidos en APOL1 mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre grupos. El análisis de sus datos con un test *post-hoc* (test de Dunn) confirmó que las diferencias significativas ocurrían al comparar los grupos SANAS vs. FMA ($p < 0,05$), por un lado, y FM vs. FMA ($p < 0,001$) por otro, pero no entre mujeres sanas y pacientes de FM. Por tanto, sólo se pudo confirmar el efecto del AOVE sobre la APOL1, que disminuye su expresión en las pacientes que consumieron este aceite. Asimismo, la estadística sobre las determinaciones clínicas de fibrinógeno y VSG confirmó la diferencia entre grupos. En este caso, el test *post-hoc* de Dunnett para comparaciones múltiples frente a un valor de referencia registró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo SANAS y FM ($p < 0,05$) en el caso del fibrinógeno, y entre los grupos SANAS ($p < 0,01$) y FMA ($p < 0,01$) con respecto a las pacientes de FM, en el caso de la VSG. De este modo, se pudo confirmar únicamente la acción normalizadora del AOVE sobre la VSG en la patología.

IV.2 DIFERENCIAS ASOCIADAS A LA FIBROMIALGIA EN EL PROTEOMA DE FIBROBLASTOS DERMALES Y EFECTO DEL TRATAMIENTO CON HIDROXITIRO SOL

IV.2.1 Diferencias asociadas a la fibromialgia en el proteoma de fibroblastos dermales

Una vez demostrada la existencia de cambios en el proteoma plasmático de las pacientes de FM, se procedió al estudio comparado del proteoma de fibroblastos dermales procedentes de una mujer sana y de una paciente de FM (**objetivo 3**).

IV.2.1.1 Nivel de estrés oxidativo

El incremento en el nivel de estrés oxidativo es una de las alteraciones que con frecuencia se han asociado a la etiopatogenia de la FM. Este hecho, unido a la relación del estrés oxidativo con muchas de las rutas que se modificaban en el proteoma plasmático de las pacientes, propició que el estudio *in vitro* se iniciara con el análisis comparado de los dos cultivos utilizados (SANAS, FM). Tal y cómo se observa en la figura 26, este nivel fue significativamente mayor en el cultivo procedente de la paciente de FM, duplicando el valor encontrado en SANAS ($p < 0,05$).

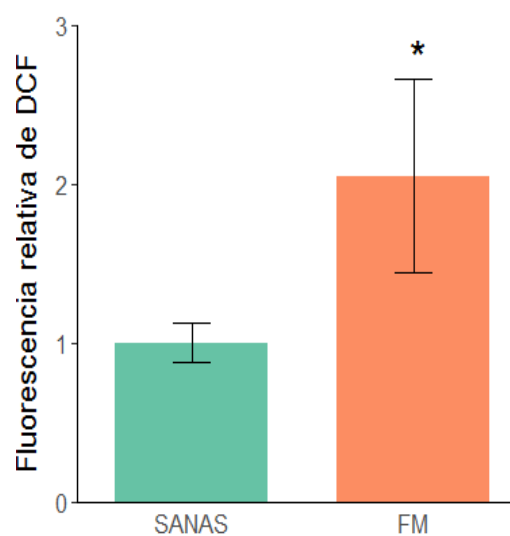


Figura 26. Nivel de estrés oxidativo basal en células de una mujer sana y de una paciente de FM (n=3). Diferencias estadísticamente significativas respecto al control: * $p < 0,05$.

IV.2.1.2 Análisis comparado del proteoma de fibroblastos

Tras confirmar la diferencia en el nivel de estrés oxidativo basal entre ambos cultivos, se procedió al estudio de su proteoma mediante nLC-MS/MS. Se detectaron un total de 816 proteínas. De estas, 357 mostraron un nivel de expresión diferencial en las células de la paciente de FM: 154 elevadas (FM/SANAS $> 1,2$; FDR $< 1\%$; $p < 0,05$) y 203 reducidas (ratio FM/SANAS $< 0,8$; FDR $< 1\%$; $p < 0,05$). El elevado número de proteínas con expresión diferencial hizo conveniente una primera aproximación con la herramienta PANTHER utilizando los términos GO. De este modo fue posible conocer las funciones de las proteínas alteradas en la patología. Atendiendo a la categoría de procesos biológicos (*PANTHER GO-Slim Biological process*) y aplicando un test exacto de Fisher con un filtro de FDR $< 5\%$, se logró

identificar más de 30 procesos biológicos alterados en FM. En la tabla 12 se muestran los 25 procesos con mayor *fold enrichment* entre las proteínas afectadas en FM.

PANTHER GO-Slim Biological Process	Client Text Box Input (357)	Client Text Box Input (fold Enrichment)	Client Text Box Input (FDR)
actin filament depolymerization (GO:0030042)	3	17.64	4.67E-02
nucleotide-sugar metabolic process (GO:0009225)	4	14.70	2.35E-02
tricarboxylic acid cycle (GO:0006099)	5	11.31	1.59E-02
cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0000904)	5	11.31	1.51E-02
chondrocyte differentiation (GO:0002062)	4	9.80	4.78E-02
bone morphogenesis (GO:0060349)	4	9.80	4.67E-02
ribosomal small subunit biogenesis (GO:0042274)	7	8.23	6.13E-03
cellular amino acid metabolic process (GO:0006520)	12	8.02	2.22E-05
aerobic respiration (GO:0009060)	5	7.54	3.63E-02
tRNA metabolic process (GO:0006399)	6	7.20	2.28E-02
skeletal system development (GO:0001501)	6	6.92	2.38E-02
cellular modified amino acid metabolic process (GO:0006575)	6	6.53	2.67E-02
formation of translation initiation ternary complex (GO:0001677)	24	6.50	2.56E-09
translational termination (GO:0006415)	24	6.50	1.71E-09
translational elongation (GO:0006414)	24	6.50	1.28E-09
organonitrogen compound metabolic process (GO:1901564)	20	6.16	1.40E-07
translation (GO:0006412)	25	5.81	3.42E-09
protein folding (GO:0006457)	10	5.03	7.14E-03
carboxylic acid catabolic process (GO:0046395)	8	5.01	2.27E-02

PANTHER GO-Slim Biological Process	Client Text Box Input (357)	Client Text Box Input (fold Enrichment)	Client Text Box Input (FDR)
organic acid catabolic process (GO:0016054)	8	5.01	2.18E-02
ER to Golgi vesicle-mediated transport (GO:0006888)	7	4.90	3.67E-02
muscle contraction (GO:0006936)	8	4.75	2.62E-02
cellular respiration (GO:0045333)	8	4.70	2.70E-02
energy derivation by oxidation of organic compounds (GO:0015980)	8	4.70	2.61E-02
muscle system process (GO:0003012)	8	4.61	2.78E-02

Tabla 12. Procesos biológicos más destacados al analizar las proteínas con expresión diferencial en fibroblastos procedentes de FM.

Del total de proteínas alteradas en FM, destacan por su valor de *fold enrichment* proteínas relacionadas con procesos metabólicos como: (i) ciclo de los ácidos tricarbóxicos ([GO:0006099](#)), (ii) metabolismo de nucleótidos ([GO:0009225](#)), (iii) metabolismo de ácidos orgánicos ([GO:0016054](#)) y (iv) metabolismo de ARN de transferencia ([GO:0006399](#)). Asimismo, se encontraron términos relacionados con la traducción ([GO:0006412](#), [GO:0006414](#), [GO:0006415](#)). Igualmente destacaron rutas más específicas íntimamente ligadas al desarrollo y funcionamiento del sistema músculo-esquelético como (i) la morfogénesis ósea ([GO:0060349](#); **O**), (ii) el desarrollo del sistema esquelético ([GO:0001501](#); **E**), (iii) la diferenciación de condrocitos ([GO:0002062](#); **C**) y (iv) la contracción muscular ([GO:0006936](#); **M**). Las proteínas participantes en estas rutas se muestran en la tabla 13.

ID en Uniprot	Nombre de la proteína	Abreviatura	Nombre del gen	Ratio (FM/SANAS)	valor de p	Ruta
P12110	Cadena alfa-2 del Colágeno tipo VI	CO6A2	<i>COL6A2</i>	0,82	8,02E-04	E/O/C
P12111	Cadena alfa-3 del Colágeno tipo VI	CO6A3	<i>COL6A3</i>	0,71	4,22E-02	
P12109	Cadena alfa-1 del Colágeno tipo VI	CO6A1	<i>COL6A1</i>	0,36	3,84E-05	
Q99715	Cadena alfa-1 del Colágeno tipo XII	COCA1	<i>COL12A1</i>	0,20	1,66E-05	

ID en Uniprot	Nombre de la proteína	Abreviatura	Nombre del gen	Ratio (FM/SANAS)	valor de p	Ruta
P50281	Metaloproteínasa 14 de la matriz	MMP14	<i>MMP14</i>	1,31	4,45E-02	E
P02452	Cadena alfa-1 del Colágeno tipo I	CO1A1	<i>COL1A1</i>	0,09	1,25E-03	
Q13976	Proteína quinasa 1 dependiente de cGMP	KGP1	<i>PRKG1</i>	1,91	1,04E-02	M
P17612	Subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP	KAPCA	<i>PRKACA</i>	1,81	3,56E-04	
P60660	Cadena ligera 6 de la Miosina	MYL6	<i>MYL6</i>	0,76	3,45E-02	
P24844	Cadena ligera 9 de la Miosina	MYL9	<i>MYL9</i>	0,58	1,32E-04	
P02511	Cadena beta de la alfa cristalina	CRYAB	<i>CRYAB</i>	0,57	7,68E-04	
Q99439	Calponina-2	CNN2	<i>CNN2</i>	0,48	2,40E-04	
Q15417	Calponina-3	CNN3	<i>CNN3</i>	0,45	2,41E-05	
Q01995	Transgelina	TAGL	<i>TAGLN</i>	0,24	5,81E-05	

Tabla 13. Proteínas indexadas en las 4 rutas moleculares relacionadas con el sistema músculo-esquelético, clasificadas según la ruta en la que participan (**E** = desarrollo del sistema esquelético; **O** = morfogénesis ósea; **C** = diferenciación de condrocitos; **M** = contracción muscular) y su ratio FM/SANAS.

IV.2.1.3 Análisis bioinformático de las proteínas diferencialmente expresadas

Tras caracterizar los principales procesos biológicos en los que participaban las proteínas cuya expresión se modificaba en el cultivo de FM, se procedió a un análisis más detallado con la ayuda del programa IPA y la base de datos KEGG.

IV.2.1.3.1 Análisis IPA

El estudio con IPA de las 357 proteínas con expresión diferencial en fibroblastos procedentes de FM mostró que un elevado número de rutas moleculares se alteraban significativamente en estos fibroblastos. De estas, un total de 4 contaban además con un Z significativo: (i) la señalización de la quinasa ligada a integrina (ILK; Z=-2,14), (ii) el ciclo de los

ácidos tricarboxílicos ($Z=2,00$), (iii) la β -oxidación de los ácidos grasos ($Z=2,00$), y (iv) la ruta de señalización de la glicoproteína VI (GP6; $Z=-2,12$; fig. 27).

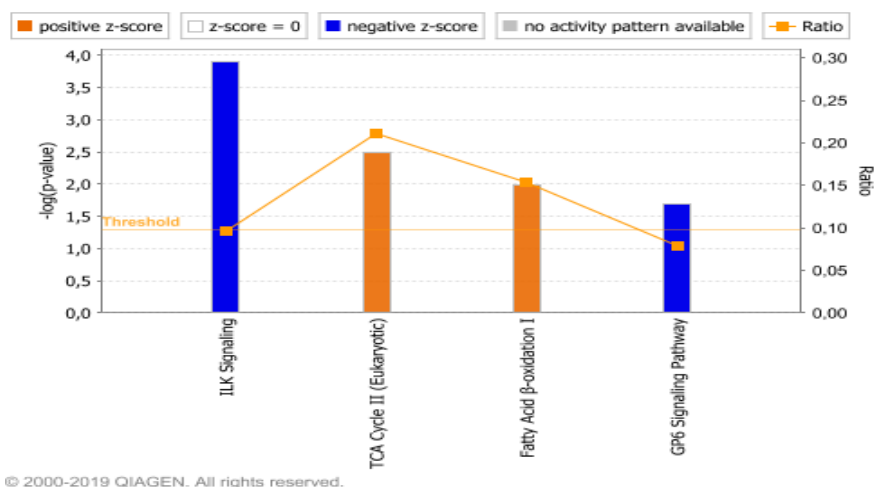


Figura 27. Gráfico de barras de IPA de las 4 rutas moleculares con Z significativo en los fibroblastos procedentes de FM. En color naranja, las rutas con estadístico Z positivo. En azul, aquellas con Z negativo.

Las proteínas indexadas para cada una de esas rutas se recogen en la tabla 14.

ID en Uniprot	Nombre de la proteína	Abreviatura	Nombre del gen	Ratio (FM/SANAS)	valor de p	Ruta
Q15257	Activador de la de la Fosfatasa proteica 2	PTPA	PTPA	1,44	3,16E-06	
P08670	Vimentina	VIME	VIM	1,40	2,00E-05	
P05556	Subunidad beta 1 de la Integrina	ITB1	ITGB1	1,38	3,45E-03	
P60953	Proteína 42 del Ciclo de división Celular	CDC42	CDC42	1,21	6,41E-03	
P35579	Cadena pesada 9 de la Miosina	MYH9	MYH9	0,77	2,18E-03	ILK
P60660	Cadena ligera 6 de la Miosina	MYL6	MYL6	0,76	3,45E-02	
E9PAV3	Subunidad alfa del Complejo asociado al polipéptido naciente	NACAM	NACA	0,68	7,30E-04	
Q9NVD7	Parvina alfa	PARVA	PARVA	0,68	2,12E-04	
P23528	Cofilina 1	COF1	CFL1	0,67	3,78E-03	

ID en Uniprot	Nombre de la proteína	Abreviatura	Nombre del gen	Ratio (FM/SANAS)	valor de p	Ruta
P60709	Actina beta	ACTB	<i>ACTB</i>	0,66	2,96E-06	
P35222	Catenina beta 1	CTNB1	<i>CTNNB1</i>	0,61	3,56E-04	
P24844	Cadena ligera 9 de la Miosina	MYL9	<i>MYL9</i>	0,58	1,32E-04	
Q9Y281	Cofilina 2	COF2	<i>CFL2</i>	0,58	1,09E-03	ILK
O14974	Subunidad reguladora 12A de la Fosfatasa proteica 1	MYPT1	<i>PPP1R12A</i>	0,54	7,61E-04	
Q14315	Filamina C	FLNC	<i>FLNC</i>	0,51	2,05E-04	
P02751	Fibronectina 1	FINC	<i>FN1</i>	0,30	5,73E-07	
O75390	Citrato sintasa	CISY	<i>CS</i>	1,72	1,08E-02	
P40926	Malato deshidrogenasa 2	MDHM	<i>MDH2</i>	1,57	5,46E-03	
Q02218	Oxoglutarato deshidrogenasa	ODO1	<i>OGDH</i>	1,53	9,28E-03	TCA
P36957	Dihidrolipoil-lisina-residuo S-succiniltransferasa	ODO2	<i>DLST</i>	1,21	8,25E-04	
P42765	3-cetoactil-CoA tiolasa mitocondrial	THIM	<i>ACAA2</i>	1,82	1,70E-04	
Q16836	Hidroxiacil-Coenzima A deshidrogenasa mitocondrial	HCDH	<i>HADH</i>	1,81	2,89E-02	
P55084	Subunidad beta de la proteína trifuncional mitocondrial	ECHB	<i>HADHB</i>	1,49	9,18E-05	BOX
P40939	Subunidad alfa de la proteína trifuncional mitocondrial	ECHA	<i>HADHA</i>	1,48	4,27E-02	
P63000	GTPasa 1 pequeña de la familia Rac	RAC1	<i>RAC1</i>	1,35	1,53E-02	
P12110	Cadena alfa-2 del Colágeno tipo VI	CO6A2	<i>COL6A2</i>	0,82	8,02E-04	GP6
P12111	Cadena alfa-3 del Colágeno tipo VI	CO6A3	<i>COL6A3</i>	0,71	4,22E-02	

ID en Uniprot	Nombre de la proteína	Abreviatura	Nombre del gen	Ratio (FM/SANAS)	valor de p	
P12109	Cadena alfa-1 del Colágeno tipo VI	CO6A1	COL6A1	0,36	3,84E-05	
Q9Y490	Talina 1	TLN1	TLN1	0,27	1,16E-04	
Q99715	Cadena alfa-1 del Colágeno tipo XII	COCA1	COL12A1	0,20	1,66E-05	GP6
P08123	Cadena alfa-2 del Colágeno tipo I	CO1A2	COL1A2	0,14	2,99E-07	
P02452	Cadena alfa-1 del Colágeno tipo I	CO1A1	COL1A1	0,09	1,25E-03	

Tabla 14. Proteínas indexadas en las 4 rutas moleculares con valores Z significativos. Las proteínas fueron clasificadas según la ruta en la que participan (**ILK** = señalización de ILK; **TCA** = ciclo de los ácidos tricarbóxicos; **BOX** = β -oxidación de los ácidos grasos; **GP6** = señalización de GP6) y ordenadas en función de su ratio FM/SANAS.

La herramienta “*Path Designer*” de IPA nos permite observar y editar rutas moleculares con el objetivo de entender mejor el papel concreto que cada proteína desempeña en ellas. De este modo, se representaron las rutas de señalización de GP6 (fig. 28), ILK (fig. 29), y aquellas relacionadas con el metabolismo: β -oxidación y ciclo de los ácidos tricarbóxicos (fig. 30).

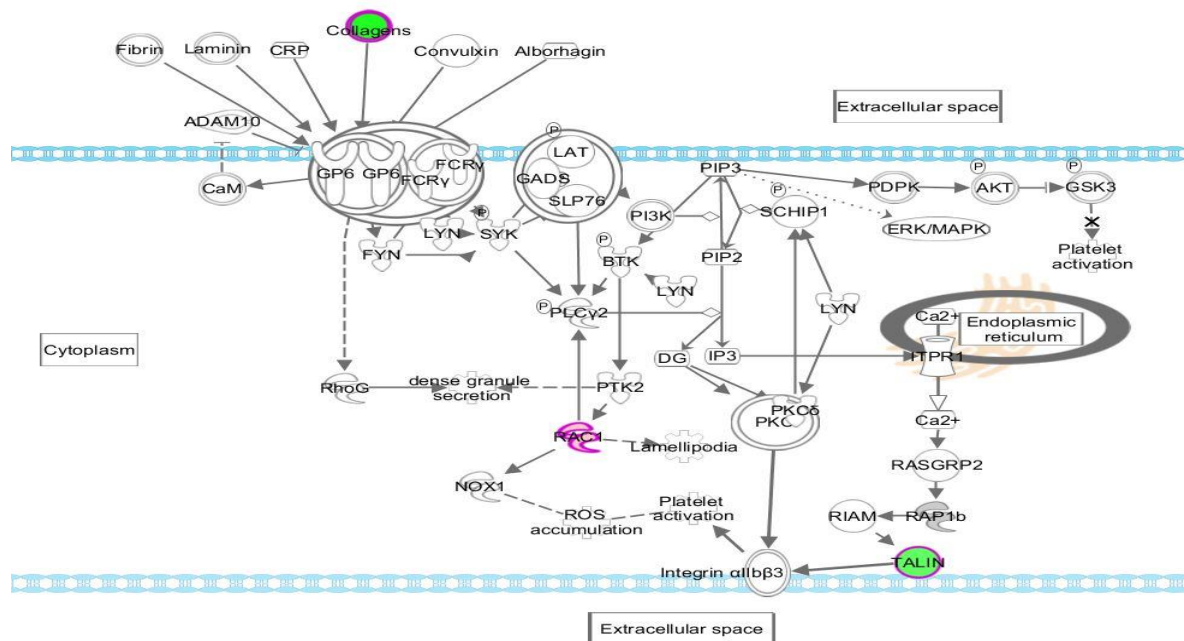


Figura 28. Representación esquemática en IPA de la ruta de señalización de GP6. Las proteínas con expresión diferencial en FM se resaltan en función de su ratio FM/SANAS: en rojo, las proteínas elevadas y en verde las proteínas con expresión reducida.

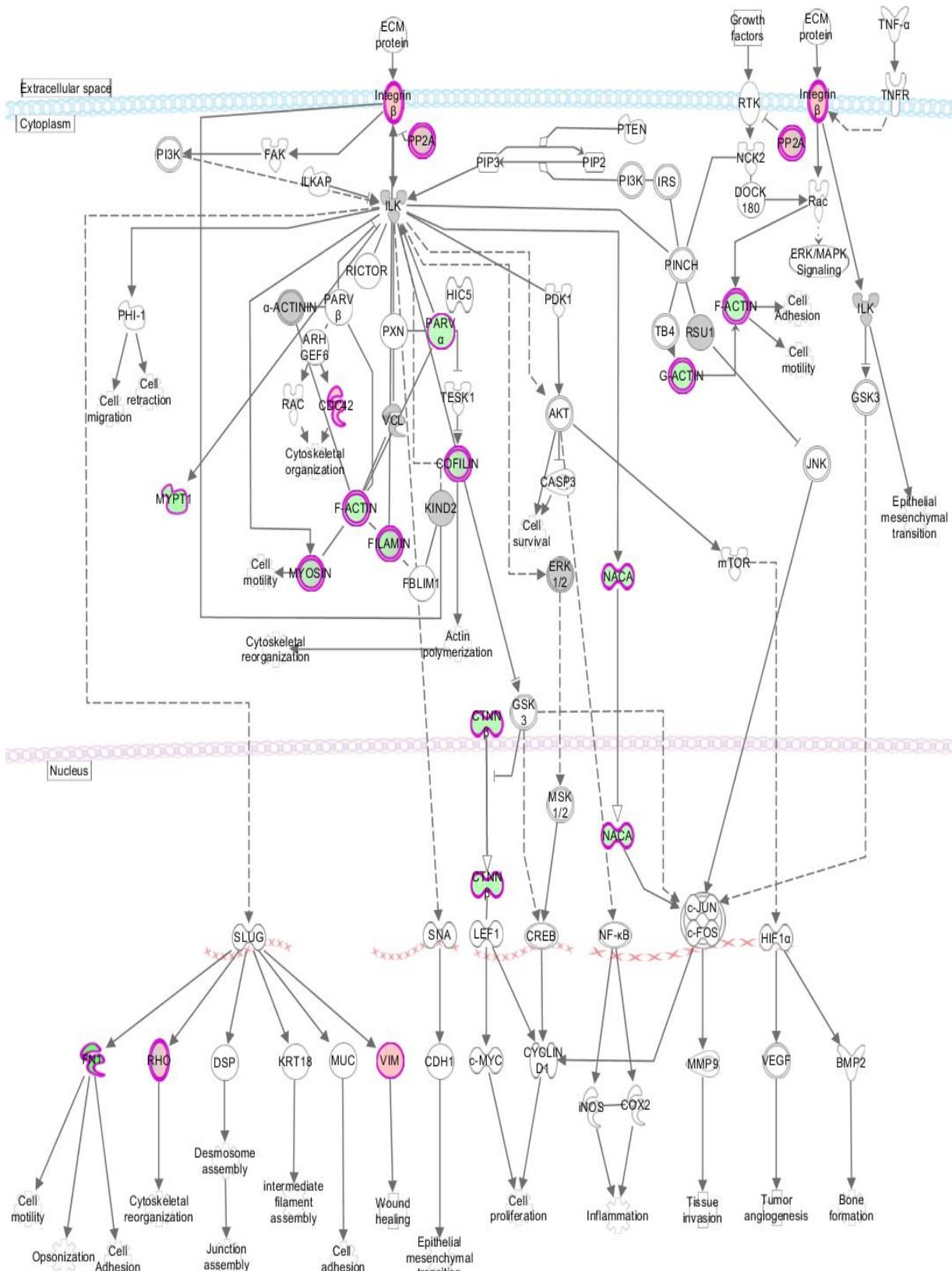


Figura 29. Representación esquemática en IPA de la ruta de señalización de ILK. Las proteínas con expresión diferencial en FM se resaltan en función de su ratio FM/SANAS: en rojo, las proteínas elevadas y en verde las proteínas con expresión reducida.

función de su ratio FM/SANAS: en rojo, las proteínas elevadas y en verde las proteínas con expresión reducida.

En el análisis del total de proteínas cuya expresión se modifica en los fibroblastos FM, resulta llamativa la clasificación “Tox” que IPA proporciona. Esta herramienta relaciona datos experimentales del tratamiento con distintos agentes tóxicos y la respuesta que estos causan. Así, la respuesta a estrés oxidativo mediada por *NRF2*, la disfunción mitocondrial o el incremento del potencial de membrana mitocondrial son algunas de las alteraciones con mayor significación estadística (tabla 15).

Top Tox Lists	p value	Overlap	Proteins
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	6.48E-07	21/182 (11.5 %)	ACTB, CCT7, DNAJA2, DNAJB11, EPHX1, ERP29, GSR, GSTO1, HACD3, HMOX1, HSP90AB1, MAP2K3, NRAS, PPIB, RALA, RRAS2, SOD2, STIP1, TXNRD1, USP14, VCP
Mitochondrial Dysfunction	5.67E-04	13/135 (9.6 %)	ATP5F1A, ATP5F1B, ATP5MF, ATP5PB, CPT1A, CYCS, GPD2, GSR, OGDH, SOD2, UQCRC2, VDAC1, VDAC2
Increases Transmembrane Potential of Mitochondria and Mitochondrial Membrane	5.74E-04	7/44 (15.9 %)	CYCS, FGF2, GSN, LGALS1, RAC1, SOD2, YWHAE

Tabla 15. Alteraciones con mayor significación estadística en las células de FM según la herramienta “Tox” de IPA.

IV.2.1.3.2 Análisis KEGG

La representación esquemática de las rutas en las que participan las proteínas con expresión diferencial en los grupos de estudio se realizó también con la herramienta “KEGG Mapper – Search & Color Pathway”. El mayor número de proteínas indexadas en KEGG (61) participaban en rutas metabólicas (*Metabolic pathways*, [hsa01100](#)). La siguiente categoría, con 22 proteínas indexadas, fueron los contactos focales (*Focal Adhesion*, [hsa04510](#)), uniones comprendidas entre la célula y la matriz extracelular (MEC; fig. 32).

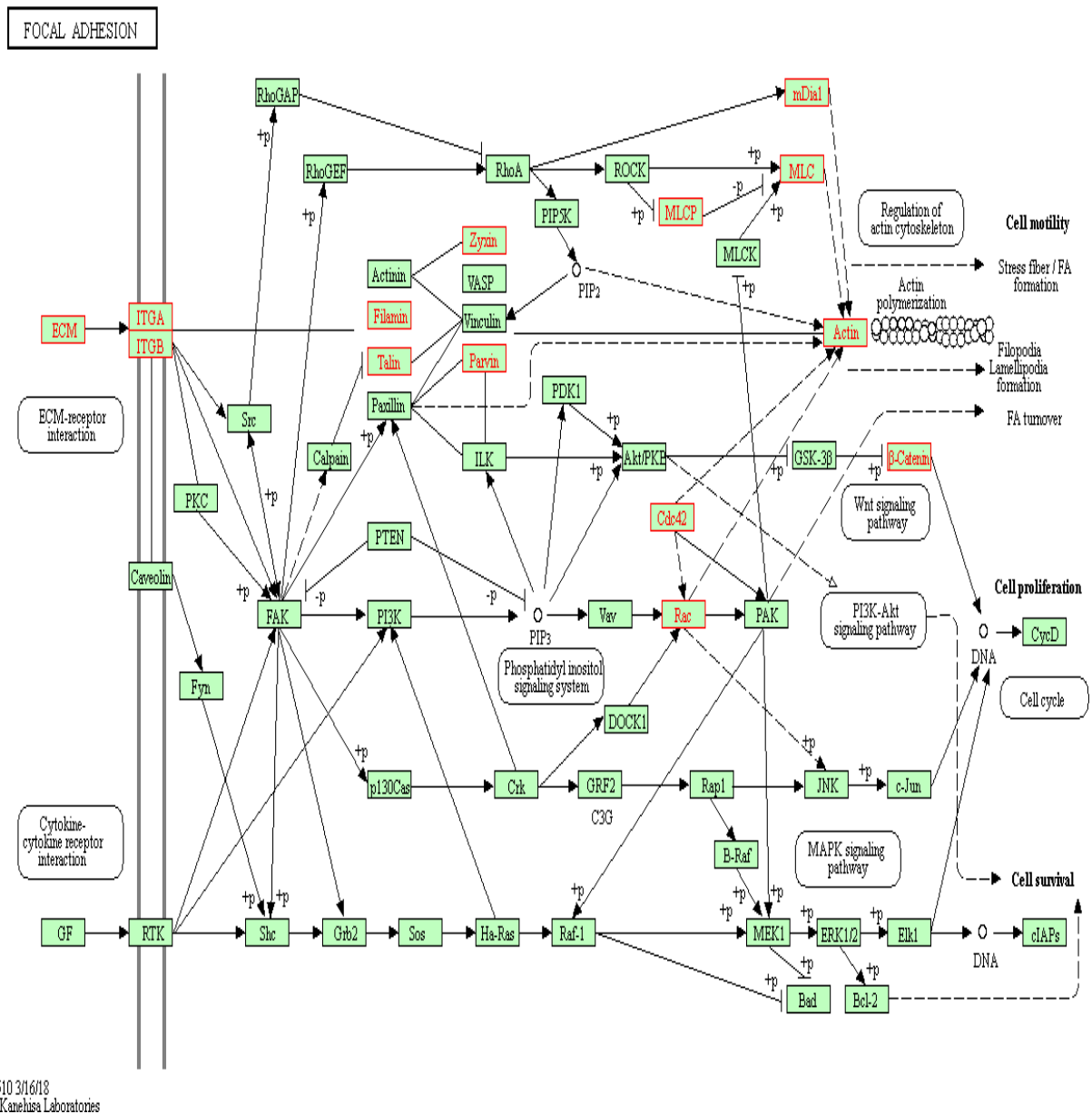


Figura 32. Representación esquemática en KEGG de la ruta de adhesión focal. En rojo, las proteínas o complejos proteicos con expresión diferencial en fibroblastos de FM.

IV.2.1.4 Validaciones de los resultados de proteómica

Del elevado número de proteínas que se mostraron alteradas en fibroblastos de FM, aquellas con mayor cambio se confirmaron por una técnica alternativa. Así, mediante western blot se corroboró la disminución en FM del colágeno I y VI (fig. 33). Utilizando la misma técnica, se intentó confirmar también la caída en el colágeno XII, aunque no fue posible detectar su expresión.

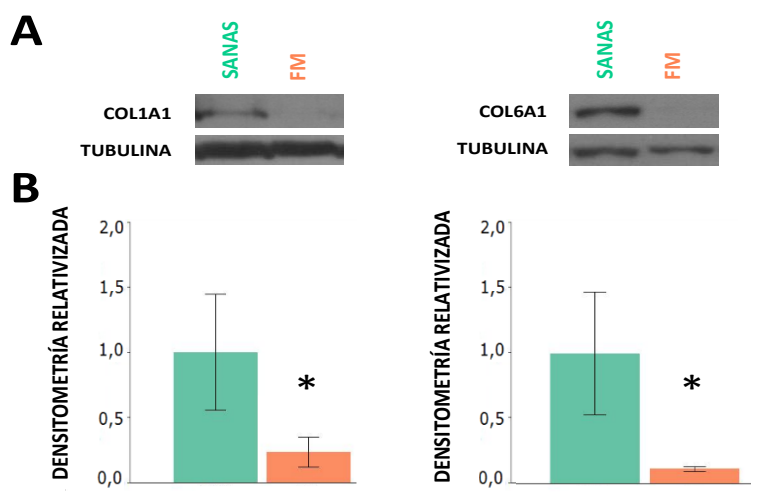


Figura 33. Análisis por western-blot de la expresión de COL1A1 y COL6A1 en fibroblastos de una mujer sana y de una paciente de FM. **A)** Autorradiografías representativas de los western-blots. La inmunodetección de α -tubulina se incluyó como control de carga. **B)** Cuantificación densitométrica de las autorradiografías de COL1A1 y COL6A1. Diferencias estadísticamente significativas respecto al control: * < 0,05

En la ruta de señalización ILK, se corroboró mediante ELISA la disminución de FINC, la proteína con menor ratio FM/SANAS (tabla 16).

Proteína	SANAS (n = 3)	FM (n = 3)	valor de <i>p</i>
FINC	1,09E-04 \pm 8,89E-06	6,37E-05 \pm 1,04E-05	< 0,005*

Tabla 16. Concentración de FINC (ng/ng proteína total) en fibroblastos de una mujer sana y de una paciente de FM. Los datos se representan como media \pm SD. Diferencias estadísticamente significativas de la comparación entre grupos: * $p < 0,005$.

IV.2.2 Efecto del hidroxitirosol en el proteoma de fibroblastos dermales

Una vez comprobado el efecto regulador del AOVE sobre los cambios encontrados en el proteoma plasmático de las pacientes de FM, y considerando la acción antioxidante y antiinflamatoria del HT, se procedió a estudiar el posible efecto beneficioso de este fenol sobre las diferencias asociadas a la FM en el proteoma de fibroblastos dermales (**Objetivo 4**).

IV.2.2.1 Efecto citotóxico del hidroxitirosol

En primer lugar, se evaluó la acción citotóxica del HT que, en el cultivo procedente de la paciente de FM, fue estadísticamente significativa a 300 μ M (fig. 34). Sin embargo, en las

células procedentes de la persona sana se observó a una concentración mucho menor (150 μM).

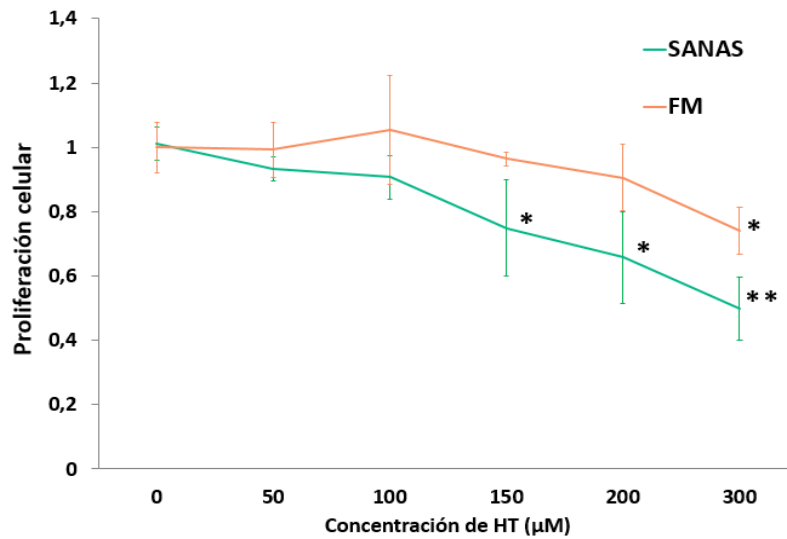


Figura 34. Efecto del HT sobre la proliferación celular ($n=3$). Diferencias estadísticamente significativas respecto a células no tratadas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

IV.2.2.2 Efecto del hidroxitirosol sobre el nivel de estrés oxidativo

Tal y cómo se observa en la figura 35, el tratamiento con distintas concentraciones no citotóxicas de HT sólo redujo el nivel de estrés oxidativo en la línea patológica (FM) y a una concentración elevada (200 μM).

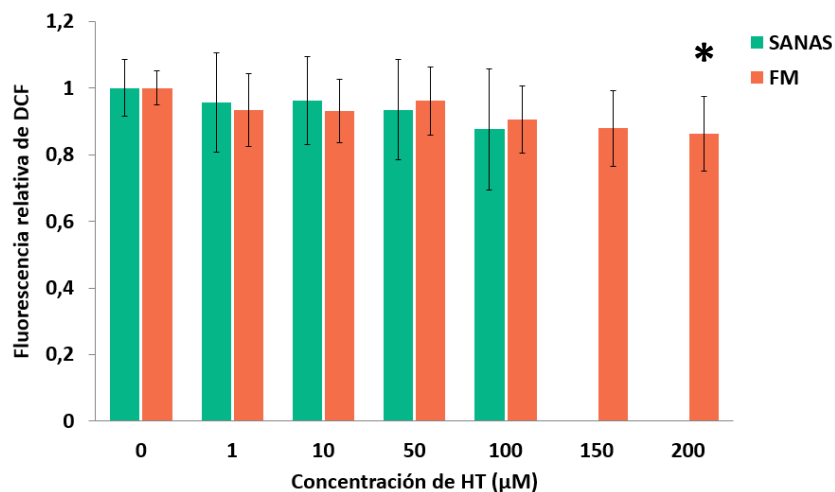


Figura 35. Efecto del HT sobre el nivel de ERO en fibroblastos de una mujer sana y de una paciente de FM ($n=3$). Diferencias estadísticamente significativas respecto al control: * $p < 0,05$.

IV.2.2.3 Análisis comparado del efecto del hidroxitirosol sobre el proteoma de fibroblastos dermales

Para estudiar el efecto del tratamiento con HT sobre el proteoma de los fibroblastos dermales, estos fueron tratados con una concentración 1,5 μ M durante 48 h. Esta concentración, además de estar lejos de aquellas citotóxicas para los cultivos, es similar a la que se puede alcanzar en sangre con la ingesta de AOVE (Oliveras-López et al., 2013).

Inicialmente, se evaluó si el tratamiento ejercía el mismo efecto en los fibroblastos procedentes de la mujer sana y de la paciente de FM. De este modo, se observó que el HT modificaba significativamente la expresión de 33 proteínas en los fibroblastos procedentes de FM, mientras que en células sanas actuaba sobre un número sustancialmente mayor, 73 proteínas (tabla 17).

Cultivo	Nº proteínas afectadas por HT	Principal proceso biológico (PANTHER <i>Fold enrichment</i>)	Principal función molecular (PANTHER <i>Fold enrichment</i>)
FM	33	NA	NA
SANAS	73	Fosforilación nucleotídica	Actividad hidrolasa

Tabla 17. Proteínas afectadas por el tratamiento con HT en fibroblastos dermales. NA: no encontrado.

En cuanto a las características bioquímicas de estas proteínas, en células sanas (fig. 36A) el mayor número de proteínas indexadas (10) fueron hidrolasas (PC00121), mientras que en células procedentes de FM (fig. 36B), el término GO con mayor presencia (4 proteínas) fue unión a ácidos nucleicos (PC00171),

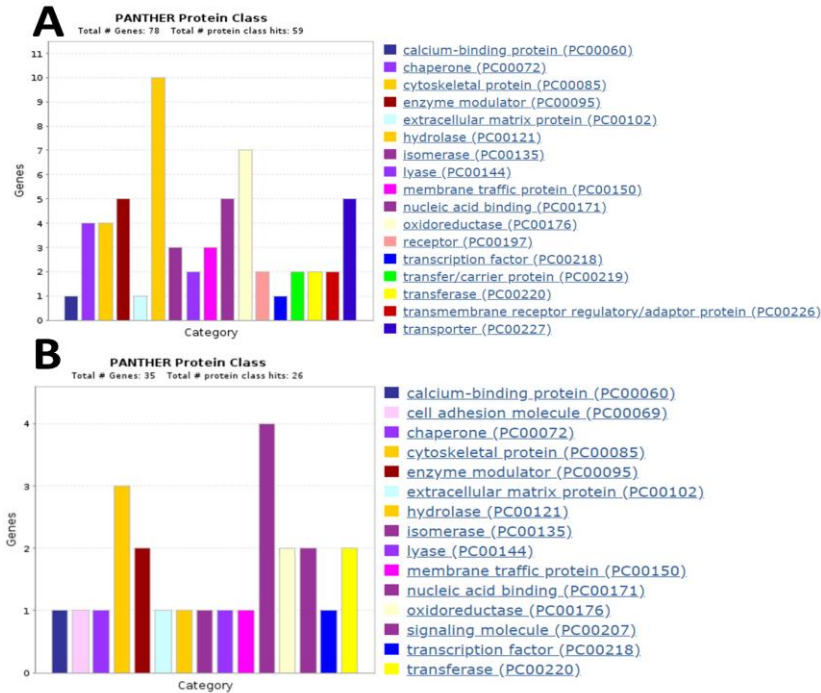


Figura 36. Clasificación PANTHER del tipo de proteínas afectadas por el tratamiento con HT en fibroblastos no patológicos (A) y procedentes de FM (B).

Las hidrolasas y proteínas de unión a ácidos nucleicos identificadas en las células de la mujer sana y de la paciente de FM, respectivamente, se muestran en la tabla 18.

ID en Uniprot	Nombre de la proteína	Abreviatura	Nombre del gen	HT	valor de p	Término GO
P15144	Aminopeptidasa N	AMPN	ANPEP	+	3,89E-02	
Q13488	Isoforma 3 de la subunidad A de la ATPasa tipo V de protones	VPP3	TCIRG1	+	8,66E-03	
P38606	Subunidad catalítica A de la ATPasa tipo V de protones	VATA	ATP6V1A	-	4,04E-02	H
P22570	Adrenodoxina reductasa mitocondrial (NAPDH)	ADRO	FDXR	+	3,32E-02	
P28838	Aminopeptidasa del citosol	AMPL	LAP3	-	2,59E-02	
Q04446	Enzima ramificadora de Glucógeno	GLGB	GBE1	+	3,91E-02	

ID en Uniprot	Nombre de la proteína	Abreviatura	Nombre del gen	HT	valor de p	Término GO
P46926	Isomerasa 1 de la Glucosamina-6-fosfato	GNPI1	GNPDA1	+	2,30E-03	
P55786	Proteína relacionada con la Aminopeptidasa sensible a Puromicina	PSA	NPEPPS	+	3,76E-02	H
Q16555	Proteína 2 relacionada con la Dihidroxi-piriminidasa	DPYL2	DPYSL2	-	4,32E-03	
Q07955	Factor de Splicing 1 rico en Serina/Arginina	SRSF1	SRSF1	-	4,68E-04	
P46777	Proteína L5 Ribosomal 6S	RL5	RPL5	-	2,55E-02	
P55010	Factor 5 de Iniciación de la Traducción en Eucariotas	IF5	EIF5	-	4,44E-02	AN
P62081	Proteína S7 Ribosomal 40S	RS7	RPS7	-	4,76E-02	

Tabla 18. Hidrolasas (H) y proteínas de unión a ácidos nucleicos (AN) afectadas por el tratamiento con HT en fibroblastos de una mujer sana y de una paciente de FM.

IV.2.2.4 Análisis bioinformático de las proteínas normalizadas por el hidroxitirosol

Este análisis se centró en el estudio de las proteínas cuya expresión se normalizaba tras el tratamiento. Un total de 91 proteínas cumplieron este criterio y fueron posteriormente analizadas con distintas herramientas bioinformáticas.

IV.2.2.4.1 Análisis IPA

El análisis IPA permitió establecer las rutas en las que participaban las proteínas normalizadas por el HT. De ellas, la de mayor significación estadística y número de proteínas (9) fue la “Remodelación de las uniones epiteliales adherens” (fig. 37).

IV.2.2.4.2 Análisis KEGG

A continuación, se abordó el estudio de las proteínas con la base de datos KEGG. Las 5 rutas con un mayor número de proteínas reguladas por el tratamiento con HT se muestran en la tabla 19.

ID en KEGG	Nombre de la ruta	Nº de proteínas	Proteínas
hsa01100	Rutas metabólicas	12	ATPK, AT5F1, BIEA, CISY, C1TC, DHB12, GFPT1, GLGB, G6PI, PURA2, STT3B, TALDO
hsa04141	Procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático	8	CRYAB, DNAJ2, SC23A, SC31A, STT3B, ERO1A, E2AK2, SAR1A
hsa04810	Regulación del citoesqueleto de actina	5	ACTB, ARC1B, COF1, COF2, MYPT1
hsa04714	Termogénesis	5	ACTB, ATPK, AT5F1, KAPCA, KGP1
hsa05205	Proteoglucanos en cáncer	5	ACTB, CD63, CTNB1, MYPT1, KAPCA

Tabla 19. Rutas en las que participan las proteínas normalizadas por el tratamiento con HT en células de FM según la base de datos KEGG.

El mayor número de proteínas indexadas por esta herramienta (12) participaban en rutas metabólicas (*Metabolic pathways, hsa01100*). La siguiente ruta identificada fue el procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático (*Protein processing in endoplasmic reticulum, hsa04141*), con 8 proteínas que respondían al tratamiento con HT (Figura 39), seguida de la ruta de regulación del citoesqueleto de actina (*hsa04810*), estructura esencial en el anclaje de las células a la MEC (fig. 40).

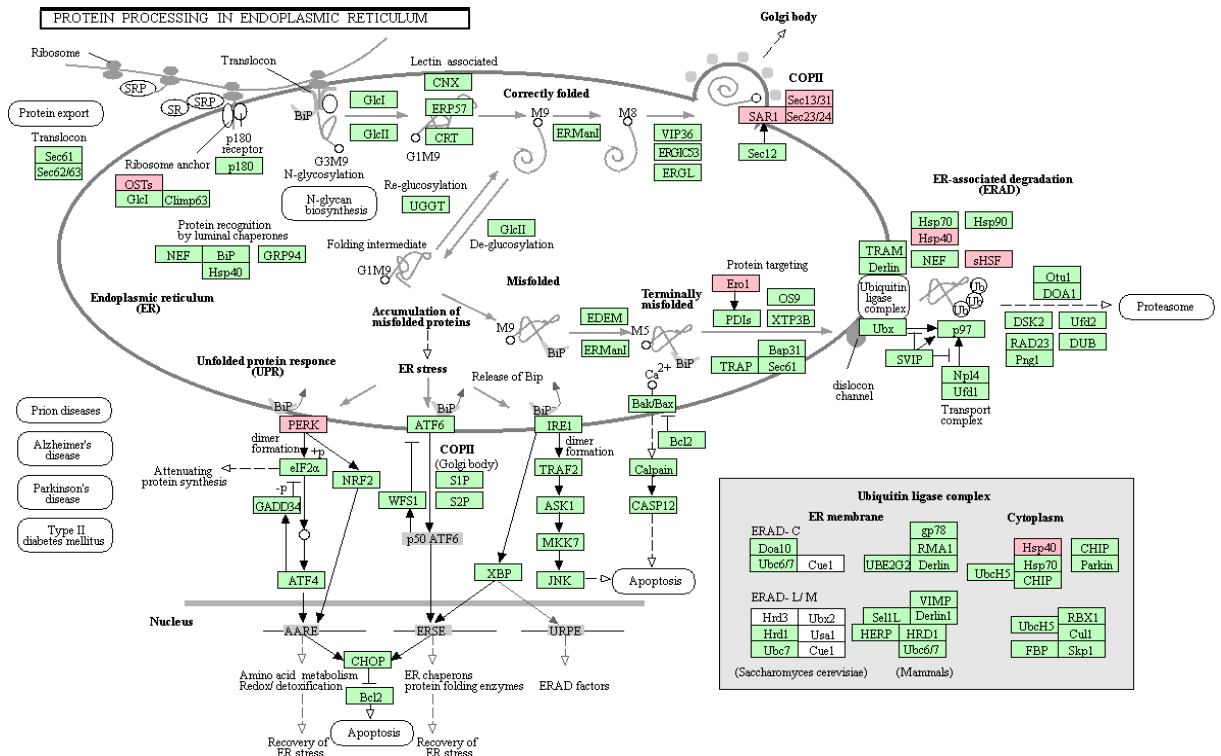


Figura 39. Representación en KEGG de la ruta de procesamiento de proteínas en el Retículo Endoplasmático. En rojo las proteínas cuya expresión se modifica en FM y se normalizan tras el tratamiento con HT.

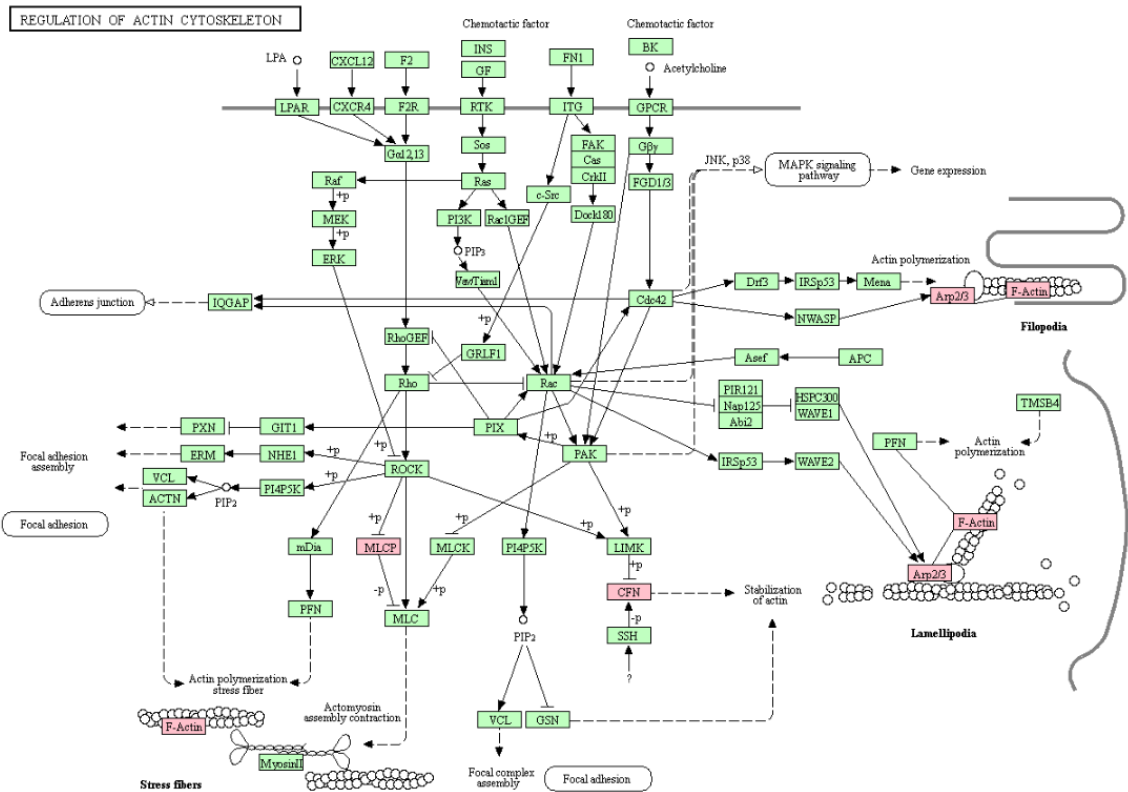


Figura 40. Representación en KEGG de la ruta de regulación del citoesqueleto de actina. En rojo las proteínas cuya expresión se modifica en FM y se normalizan tras el tratamiento con HT.

A continuación, el análisis KEGG identificó la ruta de termogénesis (fig. 41), un proceso estrechamente vinculado a la biogénesis mitocondrial.

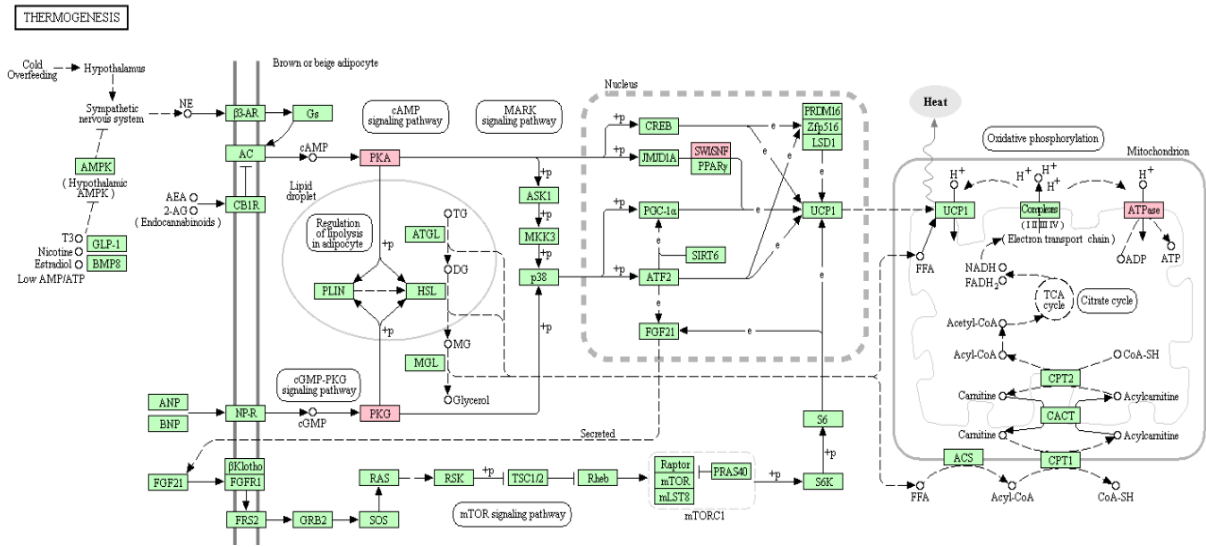


Figura 41. Representación en KEGG de la ruta de la Termogénesis. En rojo las proteínas cuya expresión se modifica en FM y se normalizan tras el tratamiento con HT.

Por último, la ruta de proteoglicanos en cáncer, con 5 proteínas relacionadas con las rutas de señalización del hialuronano, (fig. 42) y de los sulfatos de heparán (fig. 43), condroitán, dermatán y queratán (fig. 44) revertidas con el tratamiento de HT.

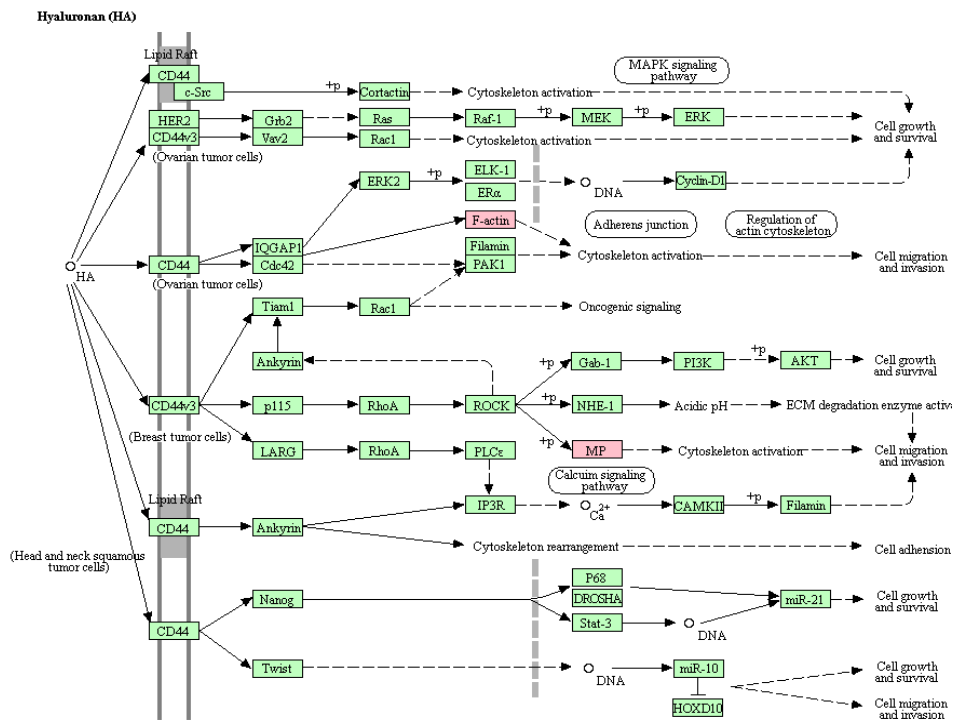


Figura 42 Representación en KEGG de la ruta de señalización del hialuronano. En rojo las proteínas cuya expresión se modifica en FM y se normalizan tras el tratamiento con HT.

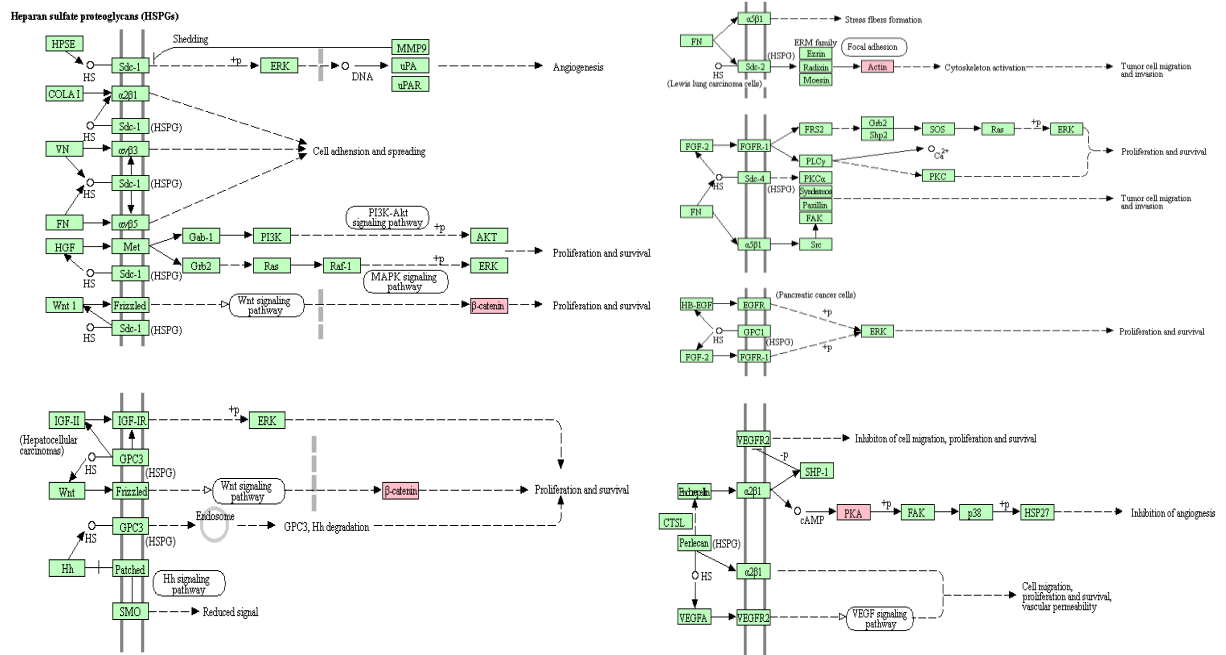


Figura 43. Representación en KEGG de la ruta de señalización del heparán sulfato. En rojo las proteínas cuya expresión se modifica en FM y se normalizan tras el tratamiento con HT.

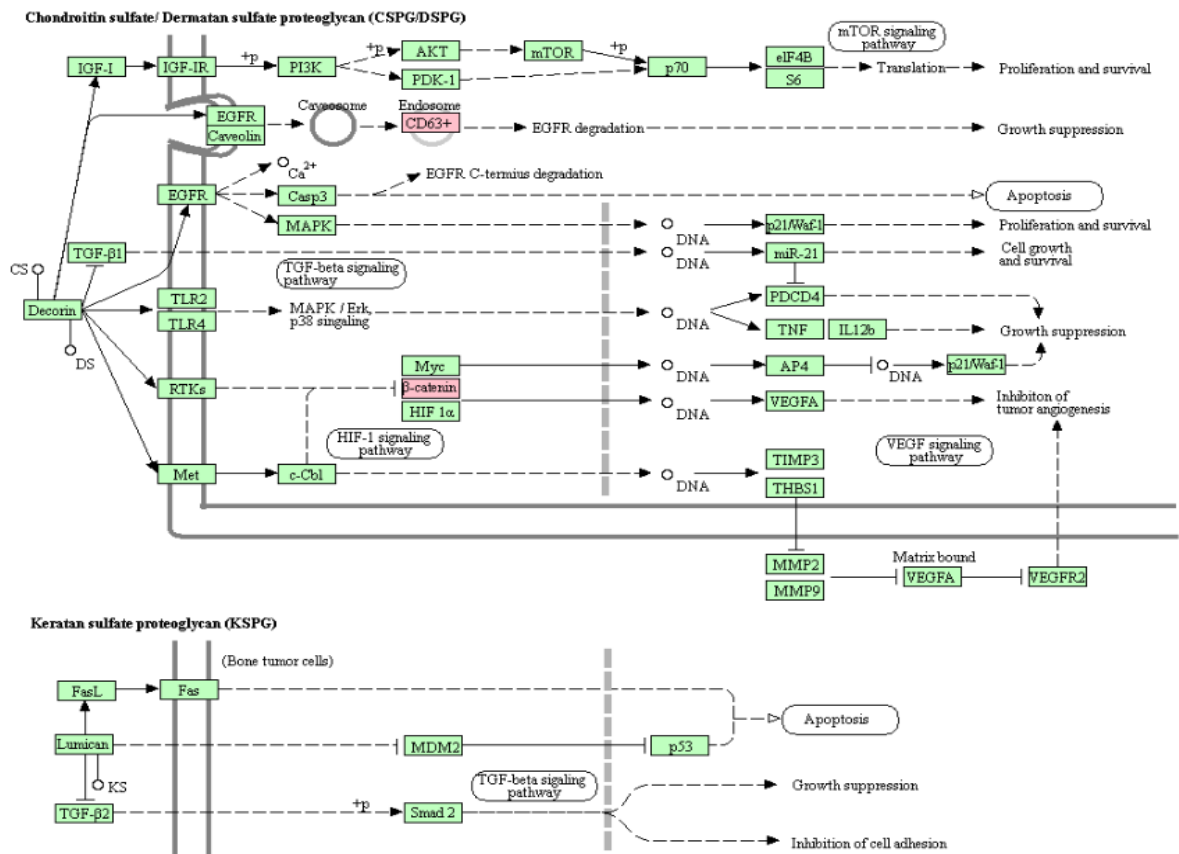


Figura 44. Representación en KEGG de las rutas de señalización de los sulfatos de condroitán, dermatán y queratán. En rojo las proteínas cuya expresión se modifica en FM y se normalizan tras el tratamiento con HT.

IV.2.2.5 Validación de las proteínas reguladas por el hidroxitirosol

De las proteínas que respondieron al tratamiento con HT destacaron la cofilina 1 (COF1) y la catenina beta 1 (CTNB1), que mostraron ratios casi idénticas a las células procedentes de la mujer sana (1,05 y 1,13, respectivamente). Estas proteínas participaban en la ruta de señalización por ILK, la más significativamente afectada en FM. Al medir los niveles de ambas por ELISA (tabla 20) se corroboró la disminución de CTNB1 en los fibroblastos procedentes de FM y su posterior reversión con el tratamiento con HT (FM+HT). Por el contrario, el test ELISA para COF1 detectó una subida en los niveles de esta proteína en los fibroblastos procedentes de FM, resultado opuesto al esperado según lo apreciado en el estudio nLC-MS/MS. Además, el HT no tuvo efecto sobre su expresión.

Proteína	SANAS (n = 3)	FM (n = 3)	FM+HT (n = 3)	valor de p
COF1	1,41E-07 ± 6,69E-09	2,24E-07 ± 1,73E-09	2,10E-07 ± 8,46E-10	< 0,001***
CTNB1	7,15E-02 ± 2,45E-03	5,11E-02 ± 1,21E-03	6,64E-02 ± 1,205E-03	< 0,001***

Tabla 20. Concentración de COF1 y CTNB1 (ng/ng proteína total) en fibroblastos procedentes de una mujer sana y de paciente de FM con y sin de HT. Los datos se representan como media ± SD. Diferencias estadísticamente significativas de la comparación entre grupos: ***p < 0,001.

V.DISCUSIÓN

V.1 DIFERENCIAS ASOCIADAS A LA FIBROMIALGIA EN EL PROTEOMA PLASMÁTICO DE PACIENTES Y EFECTO DEL CONSUMO DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

V.1.1. Diferencias asociadas a la fibromialgia en el proteoma plasmático

El estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral supone el primer análisis nLC-MS/MS con muestras de plasma sanguíneo de mujeres sanas y pacientes de FM. El objetivo inicial ha sido caracterizar los cambios en el proteoma plasmático de estas pacientes para poder así conocer las rutas moleculares afectadas en la patología. Los resultados obtenidos señalan un total de 33 proteínas plasmáticas con expresión diferencial en las pacientes de FM, de las que 25 mostraron un mayor nivel de expresión (FM/SANAS > 1,2) y 8 un nivel menor (FM/SANAS < 0,8). La primera aproximación a la interpretación de los resultados de proteómica se llevó a cabo con IPA, programa que permite vincular la expresión diferencial de proteínas con la alteración de diferentes procesos biológicos. De este modo, se pudo asociar la FM con la modificación de 25 rutas moleculares, siendo las de mayor significación estadística (i) la señalización de respuesta de fase aguda, (ii) el sistema del complemento, (iii) el sistema de la coagulación, (iv) la activación de LXR/RXR y (v) la activación de FXR/RXR.

La respuesta de fase aguda es un mecanismo complejo que el organismo ejerce frente a alteraciones locales o sistémicas de diversa índole, y que habitualmente se asocia a procesos inflamatorios (Ceciliani et al., 2002). Durante la reacción inflamatoria, el daño tisular es responsable directo de la liberación de citoquinas proinflamatorias al torrente sanguíneo. Estas citoquinas, junto a los glucocorticoides y el NO, son las encargadas de regular la síntesis de reactantes de fase aguda en el hígado (Heinrich et al., 1990; van Miert, 1995; Heinrich et al., 1998), siendo los reactantes positivos aquellos que aumentan su concentración y los negativos aquellos que la disminuyen. En los resultados de esta tesis doctoral se identificaron 14 proteínas relacionadas con la respuesta de fase aguda. De ellas, 12 (A1AG1, A1AG2, A2M, CO2, CO9, C1S, FIBB/FIBG, HPT, SAA4, SAMP, TRFE) mostraron un nivel de expresión plasmática en las pacientes de FM significativamente elevado, y 2 (ANGT, HRG) un nivel significativamente disminuido. Por otro lado, también se ha observado un incremento estadísticamente significativo de la VSG en FM, parámetro considerado como una forma indirecta de medir la respuesta de fase aguda (Assasi et al., 2015). Todos los resultados anteriores corroboran la implicación de una respuesta inflamatoria en la FM, a pesar de que la proteína ANGT, reactante positivo, disminuyó y la TRFE, reactante negativo, aumentó en el

plasma de las pacientes. Estas situaciones discordantes han sido descritas con anterioridad. Concretamente, Baralla y colaboradores (2018) observaron un incremento de TRFE en la enfermedad crónica de pulmón, patología típicamente inflamatoria. Resulta llamativo que proteínas clásicamente asociadas a la respuesta de fase aguda, como la PCR o las interleuquinas, no se elevaran en el análisis proteómico realizado. Cengic y colaboradores (2002) tampoco encontraron incremento de esta proteína en el lupus eritematoso sistémico. Igualmente, Bazzichi y colaboradores (2007b) describieron que tan solo un 25 % de los pacientes de FM presentaban una concentración elevada de PCR. No obstante, Feinberg y colaboradores (2017) lograron vincular la FM con la elevación en los niveles de PCR, aunque los valores eran cercanos a los de referencia y la correlación entre ambas variables disminuía al tener en cuenta el IMC. Precisamente, uno de los criterios de exclusión utilizados en la selección de los grupos de estudio en esta tesis doctoral fue un $IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$. Por tanto, es muy probable que la limitación en el IMC de las participantes haya impedido detectar la posible elevación de la PCR. Respecto a las interleuquinas proinflamatorias, no existe consenso en torno a sus niveles de expresión en FM. Algunos trabajos indican la existencia de niveles elevados de IL-10, IL-8 y TNF- α en las pacientes (Bazzichi et al., 2007b), mientras que otros (Wallace et al., 2016) no observaron cambios en IL-8 e IL-6. En este mismo sentido, y coincidiendo con nuestros resultados, Amel Kashipaz y colaboradores sugirieron que en monocitos circulantes de pacientes de FM, la alteración en la producción de citoquinas no era un factor dominante, y que la elevación moderada de algunas de ellas, junto con la de PCR, podría verse enmascarada por la influencia de factores como la heterogeneidad del grupo de estudio o las diferencias entre las condiciones experimentales de los estudios *in vivo* e *in vitro* (Amel Kashipaz et al., 2003).

El **sistema del complemento** y el **sistema de la coagulación** desempeñan un papel crucial en los procesos inflamatorios (Oikonomopoulou et al., 2012). De hecho, los desajustes en el sistema del complemento se han asociado a múltiples patologías entre las que se encuentran enfermedades reumáticas como la artritis (Okroj et al., 2007) y el lupus eritematoso sistémico (Wallace et al., 2016). Los resultados obtenidos en esta tesis señalan la sobreexpresión en pacientes de FM de 6 proteínas implicadas en esta ruta (CFAH, CO2, CO7, CO9, C1QC, C1S). Todas ellas, a excepción del inhibidor de la ruta alternativa del sistema del complemento (CFAH), participan en la formación del complejo de ataque a la membrana a

través de la ruta de activación clásica. Esta ruta se activa, principalmente, por complejos antígeno-anticuerpo de inmunoglobulinas G y M facilitando la quimiotaxis, la exudación de proteínas y la opsonización de las células dañadas en los sitios de inflamación (Gabay y Kushner, 1999; Ricklin et al., 2010). De hecho, junto al incremento en las proteínas del sistema del complemento, nuestros resultados muestran una mayor expresión de inmunoglobulina M en enfermas de FM. Este resultado respaldaría que la vía clásica del complemento se encontrara activada en la patología, y sugiere que dicha activación podría estar relacionada con la elevación de la VSG en las pacientes, tal y como ocurre en otras patologías inflamatorias (Wiik y Fritsler, 2008). El sistema del complemento se puede activar también por algunas proteínas de la coagulación (Oikonomopoulou et al., 2012) y los resultados de esta tesis muestran valores alterados en proteínas participantes en este proceso (fig. 16 y 18). Así, se observaron niveles elevados de fibrinógeno (FIBB y FIBG), factores de la coagulación (FA9 y FA10) y otras proteínas relacionadas con esta ruta (A2M, PROS). Entre todas ellas, los factores de la coagulación IX (FA9) y X (FA10) se han descrito como activadores del sistema del complemento (Oikonomopoulou et al., 2012). De hecho, las dos rutas con mayor ratio FM/SANAS en el análisis IPA del proteoma plasmático fueron la activación intrínseca y extrínseca de la protrombina, lo que corroboraría la importancia del proceso de coagulación en FM. En línea con estos resultados, Milovanovic y colaboradores (2016) ya habían descrito la presencia de una mayor activación plaquetaria en estas pacientes. Sin embargo, otros autores (Berg et al., 1999) aunque confirman la existencia de mayor nivel de fibrinógeno en pacientes con síndrome de fatiga crónica y FM, no siempre lo asocian con activación plaquetaria. Los resultados obtenidos en el análisis proteómico de este trabajo, corroborados por el valor de fibrinógeno obtenido mediante un test habitual en diagnóstico clínico, confirman que las pacientes de FM podrían sufrir una anomalía en el proceso de coagulación tal y como ha sido apuntando recientemente por nuestro grupo (Molina et al., 2019).

El estudio del proteoma plasmático de las pacientes de FM señala igualmente la implicación en la patología de la **ruta de activación de LXR/RXR**, con 9 proteínas anotadas (ANGT, APOC2, APOL1, A1AG1, A1AG2, CD14, CO9, SAA4 y TRFE) y la **ruta de activación de FXR/RXR**, con otras 9 proteínas (ANGT, APOC2, APOL1, A1AG1, A1AG2, CO9, FETUB, SAA4 y TRFE). Además, la ruta LXR/RXR obtuvo un valor Z de 2,33 que permite inferir su estado de activación en FM. El receptor RXR de la familia de receptores retinoides forma heterodímeros

con otros receptores nucleares como FXR, LXR o los receptores de hormonas tiroideas (Bugge et al., 1992). Estos complejos se han estudiado en distintas patologías asociadas con la inflamación y el metabolismo lipídico (van Diepen et al., 2013). De hecho, el diagrama de Venn (fig. 15) apunta a la estrecha relación de ambos receptores con la respuesta de fase aguda. El receptor LXR se une a oxisteroles para activar la proteína 1c de unión al elemento regulador de esteroides. Esta proteína actúa como factor de transcripción esencial en la lipogénesis (Schultz et al., 2000; Yoshikawa et al., 2001) favoreciendo la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el transporte y metabolismo lipídico tales como las apolipoproteínas C-I, C-IV y CII (Mak et al., 2002); la última de ellas elevada en las pacientes de FM de esta tesis. El receptor LXR también desempeña un papel regulador en los procesos inflamatorios al activar el transporte inverso de colesterol en los macrófagos, evitando así su transformación en células espumosas e inhibiendo distintos factores de transcripción proinflamatorios (van Diepen et al., 2013). El receptor FXR desempeña un papel muy similar, regulando el metabolismo de TAG y colesterol e inhibiendo los procesos inflamatorios (van Diepen et al., 2013). Esta actividad antiinflamatoria, común en los dos receptores nucleares, sugiere que la activación de las rutas LXR/RXR y FXR/RXR podría estar ligada a un intento de paliar el estado proinflamatorio que subyace en las pacientes de FM. Los glucocorticoides también realizan una importante función antiinflamatoria. Este grupo de hormonas esteroideas están implicadas en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y aumentan su secreción ante diferentes formas de estrés regulando el proceso inflamatorio (Guyton et al., 1971). En este sentido, y coincidiendo con lo descrito por Lentjes y colaboradores (1997), en la cohorte de pacientes de esta tesis doctoral se ha observado que el nivel del principal transportador de cortisol en la sangre (CBG) disminuía. Esta proteína es procesada por la elastasa de los leucocitos en los lugares de inflamación, induciendo la transición de su conformación S (estresada) a R (relajada) con la consiguiente liberación de la hormona cortisol (Lewis et al., 2005). No existe acuerdo en relación al efecto que la FM puede ejercer en los niveles de cortisol. En un estudio previo de nuestro grupo y en concordancia con otros autores (Crofford et al., 2004; Gur et al., 2004; Bote et al., 2012; Freitas et al., 2012), no se apreció ninguna variación en la concentración de esta hormona. En este contexto, la disminución en la expresión de CBG en las pacientes de este estudio podría deberse a un intento del organismo de aumentar la biodisponibilidad de la hormona libre en sangre. No obstante, es posible que el cortisol liberado sea incapaz de ejercer su acción antiinflamatoria por la existencia de

anomalías en su receptor celular. De hecho, parece que la terapia con glucocorticoides en pacientes de FM no ha tenido mucho éxito (Skaer, 2014).

Las alteraciones físicas y psicológicas típicas de la FM se asocian a procesos neuroinflamatorios (Miller y Raison, 2016). Por tanto, la respuesta de fase aguda que se aprecia en el proteoma plasmático de la cohorte de pacientes de FM que han participado en este estudio, podría estar relacionada con los valores obtenidos por estas en el cuestionario de salud SF-12 en sus dos vertientes, PCS-12 y MCS-12. El estrés y la inflamación están fuertemente relacionados con una mayor producción de ERO y ERN, especialmente en los macrófagos (Forman y Torres, 2001; Vieira-Potter, 2014). De hecho, nuestros resultados muestran la producción de NO y ERO en macrófagos como una de las rutas con una mayor puntuación Z ($Z = 2,24$). En efecto, nuestro grupo había demostrado en muestras de sangre que las pacientes de FM tenían mayores niveles de daño oxidativo en el ADN y menor capacidad antioxidante (La Rubia et al., 2013). Tanto el estudio proteómico de esta tesis como la posterior confirmación con un método habitual en diagnóstico clínico señalan a la HPT como una de las proteínas más elevadas en FM. La HPT, reactante de fase aguda positivo con efecto antioxidante, es capaz de unirse a la hemoglobina para prevenir así la liberación de hierro y la consiguiente formación de ERO. De este modo, su elevación contrarrestaría el daño oxidativo que en el tejido muscular genera atrofia o debilidad (Bertaggia et al., 2014), síntomas comunes en la FM. El aumento de HPT en plasma se documentó hace tiempo en pacientes con depresión (Maes et al., 1993; Erdem et al., 2011) y en mujeres con dolor crónico difuso (Wåhlén et al., 2017). Este último trabajo, sugiere que la inflamación sistémica asociada a la elevación en los niveles de HPT tendría efectos negativos sobre el sistema nervioso central que, a su vez, explicaría las alteraciones psicológicas de estas pacientes. El perfil proteómico descrito por Wåhlén y colaboradores es muy similar al encontrado en esta tesis, con desajustes en los niveles de proteínas del sistema del complemento, la coagulación y los procesos inflamatorios. Estas rutas aparecen también muy interrelacionadas en el gráfico de *Networks* que IPA generó con 23 de las 33 proteínas alteradas en el plasma de las pacientes de FM (fig. 17). En él, se pueden apreciar nodos como el de las citoquinas proinflamatorias o ERK1/2 que también se han visto implicadas en el dolor, en la ansiedad y en la depresión asociadas al mismo (Borges et al., 2015). Por tanto, nuestros resultados sugieren la

importancia de la inflamación en las pacientes de FM y su posible relación con los síntomas físicos y psicológicos que estas padecen.

Por último, se elaboraron curvas ROC para las proteínas diferencialmente expresadas, con el objetivo de conocer su utilidad diagnóstica en la patología. El elevado valor de área bajo la curva de las proteínas C1S y HPT las sitúa en un buen punto de partida para ser consideradas potenciales marcadores de la patología en estudios futuros. No obstante, la validación analítica de estos posibles marcadores deberá ser en cohortes de pacientes mayores y teniendo en cuenta la evolución temporal de las concentraciones de los mismos, un punto que limita considerablemente la utilización de las curvas ROC en la investigación clínica (Kamarudin et al., 2017).

V.1.2 Efecto del consumo de una dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra en el proteoma plasmático de pacientes de fibromialgia

El estudio proteómico en plasma de pacientes de FM confirma la implicación del estrés oxidativo y la inflamación en esta patología. En este contexto, y complementariamente al tratamiento farmacológico y psicológico de la FM, se han puesto en práctica distintas intervenciones nutricionales con agentes antioxidantes/antiinflamatorios. Concretamente, nuestro grupo ha demostrado que una intervención nutricional con AOVE reduce el daño oxidativo y mejora la percepción del estado de salud de las pacientes de FM (Rus et al., 2016b), sugiriendo que este aceite podría ser un buen complemento en el tratamiento. En base a estos antecedentes, el siguiente objetivo en esta tesis fue valorar el efecto que una dieta enriquecida con AOVE ejercía sobre el perfil proteómico de un grupo de pacientes de FM (FMA). Estas pacientes consumieron 50 ml diarios de AOVE en crudo, repartidos en las comidas principales, durante un periodo de 3 semanas. Silva y colaboradores (2015a) habían observado que la administración de aceite de oliva en individuos sanos durante 6 semanas era capaz de provocar cambios en el proteoma de la orina y, más concretamente, en el nivel de colágeno α -1 y α -2. En nuestro estudio demostramos que el efecto modulador del AOVE sobre el proteoma plasmático es significativo mucho antes, puesto que 3 semanas fueron suficientes para modificar el nivel de expresión de 20 proteínas que afectaban a 26 rutas moleculares. Las de mayor significación estadística fueron (i) señalización de respuesta de fase aguda (AACT, C4BPA, C4BPB, FIBG, FINC, HEMO, SAA4), (ii) activación de LXR (APOC2, APOL1, FETUB, HEMO, SAA4), (iii) activación de FXR (APOC2, APOL1, HEMO, SAA4), (iv) sistema del complemento

(CO8A, C4BPA, C4BPB) y (v) señalización de endocitosis mediada por clatrina (ACTB, APOC2, APOL1, SAA4). El hecho de que todas ellas, a excepción de la última, aparezcan entre las rutas más significativamente alteradas en FM, sostiene la hipótesis del efecto beneficioso del AOVE como complemento en esta patología.

Muchas de las proteínas que respondieron al consumo de AOVE se habían detectado en el perfil proteómico de la FM. No obstante, cabe destacar que las dos proteínas con mayor y menor ratio, fibronectina 1 (FINC; Ratio FM/FMA = 6,95) y adiponectina (ADIPO; Ratio FM/FMA = 0,30), aparecen por primera vez en este estudio comparado. La fibronectina es una proteína ubicua en el organismo que presenta dos isoformas, una insoluble y otra soluble que circula en la sangre (Zerlauth y Wolf, 1984). Esta proteína, es un componente principal de la MEC (Mosher, 1984) donde se une a las fibras de colágeno participando en funciones como la migración, la proliferación, el movimiento celular y la activación del sistema inmune con la consiguiente respuesta inflamatoria (Sorokin, 2010). En línea con esta hipótesis, el gráfico *Networks* generado con 13 de las 20 proteínas afectadas por el consumo de AOVE (fig. 23) relacionó el tráfico de células inmunes, la señalización e interacción celular y el desarrollo y la función del sistema hematológico. En dicho gráfico, se apreciaban como nodos centrales proteínas muy relacionadas con la inflamación, como ERK1/2, PI3K y Akt). El papel del AOVE como modulador de la respuesta inmune se ve reforzado por su efecto sobre el **sistema del complemento**, de vital importancia en la respuesta inmune innata. Así, las mujeres de este grupo mostraron niveles mayores de inhibidores de la proteína del complemento C4 (C4BPA, C4BPB), así como una menor concentración de la proteína CO8A, implicada en el complejo de ataque a la membrana. La isoforma soluble de la FINC también actúa en la coagulación, participando junto al colágeno y al factor XIIIa en la formación del coágulo (Mosher y Schad, 1979; Wang et al., 2014). Los resultados de esta tesis sugieren la presencia de un estado protrombótico y proinflamatorio en las enfermas de FM, por lo que la capacidad del AOVE para reducir drásticamente los niveles de FINC en enfermas de FM es beneficioso en esta enfermedad.

Un comportamiento completamente distinto es el que presenta la ADIPO, proteína que más incrementó su nivel de expresión con el consumo de AOVE en FMA. Esta proteína con función hormonal se sintetiza en células del tejido adiposo, aunque también en células del músculo esquelético y en células endoteliales (Arita et al., 1999; Ramakrishnan y Jialal, 2019).

Las funciones de la ADIPO son múltiples y la mayoría se encuadran en el metabolismo lipídico y glucídico (Stefan y Stumvoll, 2002). Así, esta adipoquina aumenta la sensibilidad a la glucosa y su transporte al músculo y al hígado, gracias a la activación de la quinasa dependiente de AMP (*PRKAA1*; AMPK) y del receptor alfa activado por proliferadores de peroxisomas nuclear (*PPARA*; Ramakrishnan y Jialal, 2019). La ADIPO también tiene un efecto antiinflamatorio y antioxidante en macrófagos, tejido endotelial y muscular gracias a que inhibe la secreción de PCR y las rutas de señalización de NF- κ B y TNF- α (Devaraj et al., 2008; Turer y Scherer, 2012). Estas propiedades la han convertido en una diana terapéutica en patologías del grupo de las miopatías (Gamberi et al., 2019), en las que mejora la atrofia muscular, también presente en FM. Este efecto parece estar mediado no solo por la activación de AMPK, sino también de Akt (Singh et al., 2017), una de las proteínas vinculadas en este estudio a la FM (gráfico *Network* de IPA, fig. 23). Con esta perspectiva, el importante incremento que el AOVE provoca en los niveles de ADIPO en FMA convierte a esta proteína en una de las potenciales responsables de la mejora observada por nuestro grupo en las pacientes de FM que consumieron este aceite (Rus et al., 2016b).

Junto al marcado efecto que el consumo del AOVE ejerció en los niveles de FINC y ADIPO de pacientes de FM, también se produjo la reversión a niveles similares a los encontrados en las mujeres sanas de otras 7 proteínas: ACTB, APOC2, APOL1, CBG, FIBG, SAA4, THBG. FIBG y SAA4 son dos **reactantes de fase aguda**. La primera de ellas es una proteína esencial en el proceso de **coagulación**, ruta sobre la que se ha descrito que el AOVE ejerce un efecto modulador (Yubero-Serrano et al., 2018). La valoración de este parámetro en las pacientes de FMA por un test habitual en el diagnóstico clínico de referencia no permitió confirmar la reversión a niveles normales de esta proteína. Este resultado puede responder al comportamiento diferencial entre las dos cadenas de fibrinógeno (β y γ) que se apreció en el estudio proteómico, pues la ausencia de respuesta de la cadena β podría estar enmascarando los resultados. Coincidiendo con estos resultados, Yubero-Serrano y colaboradores (2018) tampoco lograron demostrar el efecto del consumo de este aceite sobre el fibrinógeno. El segundo reactante de fase aguda normalizado por el consumo de AOVE fue SAA4 que, además, participa en la **activación de LXR y FXR**, así como en una ruta no mencionada hasta ahora: la señalización de endocitosis mediada por clatrina. Esta apolipoproteína forma parte de las lipoproteínas de alta (HDL) y de muy baja densidad (VLDL) y supone más del 90 % del

contenido de proteínas séricas amiloides A en condiciones fisiológicas (de Beer et al., 1995). Aunque clásicamente se la ha señalado como una proteína constitutiva (Steel et al., 1993; Uhlar et al., 1994), algunos autores han comenzado a observar que es capaz de responder ante procesos proinflamatorios. En este sentido, Jumeau y colaboradores (2019) han observado en macrófagos humanos M1 que el tratamiento con LPS-dexametasona provocaba un incremento moderado en su expresión. Con anterioridad, SAA4 fue propuesta incluso como marcador de artritis reumatoide por Seok y colaboradores (2017), quienes confirmaron en suero la correlación positiva entre el factor reumatoide y SAA4 por LC-MS/MS libre de marcaje.

El consumo de AOVE también normalizó los valores de las proteínas ACTB, APOC2 y APOL1. Estas, junto a SAA4, participan en la **ruta de endocitosis mediada por clatrina**, principal vía de endocitosis en las células de mamíferos. Este proceso ejerce un papel importante en el recambio de receptores transmembrana, el remodelado de la membrana plasmática, la señalización celular y la internalización de hormonas, entre otros (Mettlen et al., 2018). Además, resulta clave para el buen funcionamiento del sistema músculo-esquelético al facilitar la regeneración muscular (Hoshino et al., 2013) y la organización de la sarcómera (Vassilopoulos et al., 2014). Por tanto, el que el AOVE normalice los niveles de estas proteínas podría resultar muy beneficioso para una paciente de FM. Si bien es cierto que no se ha descrito ningún efecto del AOVE sobre esta ruta, López y colaboradores (2014) comprobaron que este aceite protegía la integridad y el adecuado funcionamiento de la membrana plasmática, unos beneficios que fueron atribuidos al ácido oleico y a sus compuestos minoritarios. Si analizamos cada una de las proteínas anotadas en la endocitosis mediada por clatrina, ACTB es una proteína citoesquelética con múltiples funciones, entre las que se encuentra el crecimiento, la migración celular, la cicatrización, la respuesta inmune (Bunnell et al., 2011) y la unión célula-célula de las células endoteliales (van Buul y Timmerman, 2016). Por tanto, la liberación de ACTB al torrente sanguíneo podría estar vinculada con la muerte celular de las células endoteliales y la consiguiente permeabilización de los vasos sanguíneos a nivel local (Zhang et al., 2012). Lind y Smith (1991) comprobaron hace décadas la capacidad inhibitoria que la actina liberada en los sitios de inflamación y lesión tisular ejercía sobre la fibrinólisis y fibrinogenolisis. Esta acción dificultaría la disolución del coágulo y favorecería aún más el estado protrombótico y proinflamatorio que parece subyacer

a la FM. En este contexto, la disminución del nivel de ACTB provocada por el consumo de AOVE en las pacientes de FM podría reflejar una mayor integridad del tejido endotelial. Esta idea, que ya fue sugerida por Katsarou en modelos murinos (Katsarou et al., 2015), supondría una reducción de los efectos deletéreos de la alteración en los niveles de ACTB a nivel de la circulación sanguínea. No obstante, la reversión en la expresión de ACTB indicada en el análisis proteómico no pudo ser confirmada por ELISA, posiblemente por la pequeña ratio FM/FMA obtenida en el análisis nLC-MS/MS. En la ruta de endocitosis mediada por clatrina acompañan a la ACTB otras 3 proteínas que, como ya se mencionó con anterioridad, están vinculadas también al metabolismo lipídico: APOC2, APOL1 y SAA4. La primera de ellas, al igual que la SAA4, circula en la sangre unida principalmente a quilomicrones, VLDL y HDL (Jong et al., 1999). Aunque esta proteína actúa como activadora de la lipoproteína lipasa, sus niveles elevados en sangre inhiben esta acción enzimática (Jong et al., 1999), dificultando la hidrólisis de TAG y, por tanto, la distribución de ácidos grasos a los tejidos. Además, estos niveles anormalmente altos se han asociado a un transporte inverso de colesterol defectuoso que impide la correcta maduración de las HDL (Lewis y Rader, 2005). En este sentido, es probable que el efecto regulador que el AOVE ejerce sobre los niveles de APOC2 esté contribuyendo al control de un correcto metabolismo lipídico. En línea con estos resultados, Anderson-Vasquez y colaboradores (2015) comprobaron que la sustitución de la mantequilla como fuente de grasa por AOVE lograba la disminución de las ratios Colesterol total/HDL y TAG/HDL en mujeres postmenopáusicas, precisamente el grupo poblacional con mayor incidencia de FM. Junto a APOC2 y SAA4, la APOL1 también disminuyó su expresión tras la ingesta de AOVE hasta igualarse con la del grupo de mujeres sanas. Esta proteína forma parte de las HDL y, en pequeñas cantidades de las VLDL (Duchateau et al., 1997), y suele ir acompañada de otras apolipoproteínas como la APOA2, la APOA4, la APOC3 y la APOA1. Esta última, es el componente principal de las HDL, aunque tan solo el 10 % de las partículas que la contienen poseen también entre sus constituyentes a la APOL1 (Duchateau et al., 1997). Este hecho podría indicar la existencia de una función específica dentro de esta subpoblación de HDL que estaría vinculada con la función de la APOL1 en el sistema inmune, como sugieren Madhavan y O'Toole (2014), o incluso con el papel que esta apolipoproteína parece tener en inflamación, contexto en el que citoquinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α inducen su expresión (Wan et al., 2008). De hecho, ciertas variantes génicas del gen *APOL1* se han vinculado con una mayor expresión proteica y con la activación del inflamasoma o la liberación de interferón en

el lupus eritematoso sistémico (Blazer y Clancy, 2017), patología que suele acompañar a la FM (Haliloglu et al., 2014). La acción del AOVE sobre el perfil lipídico se ha estudiado ampliamente, observándose que su ingesta lo mejora en parámetros como el nivel de TAG (Carnevale et al., 2017) o el índice aterogénico del plasma TAG/HDL-Colesterol (Violante et al., 2009). Por tanto, la disminución de APOL1 en las pacientes FMA, detectada en el análisis proteómico y corroborada por ELISA, serviría de ayuda para paliar el estado proinflamatorio y la alteración del perfil lipídico que sufren estas pacientes (Rus et al., 2016a) y que se asocian a los síntomas clínicos de la enfermedad (Cordero et al., 2014a).

Por último, y aunque el **transporte de hormonas** no es una ruta detectada en el análisis IPA, dos proteínas de la misma se normalizan por efecto del AOVE: el transportador de glucocorticoides (CBG) y el de tiroxina (THBG), el último de ellos entre las proteínas con mayor significación estadística. CBG es el principal transportador de glucocorticoides en plasma y, como ya se mencionó con anterioridad, su expresión reducida en FM podría deberse a un intento de aumentar la concentración libre en plasma de estos. El efecto del aceite sobre los niveles de corticoides apenas ha sido estudiado. Un trabajo llevado a cabo en roedores que seguían una dieta cuya fuente de grasas era el aceite de oliva confirmó el aumento del tamaño de la glándula adrenal y de los niveles de corticosterona plasmática (Takeuchi et al., 2001). Aunque el cortisol es el principal glucocorticoide en humanos, esta hormona no parece tener un comportamiento definido en FM. Por tanto, sería interesante evaluar los niveles sanguíneos de corticosterona en la cohorte de este estudio y conocer la relación entre estos y la expresión de CBG. El consumo de AOVE también revirtió los valores en enfermas de FM del transportador de mayor afinidad a las hormonas tiroideas en sangre, la proteína THBG. Esta proteína es la responsable de transportar aproximadamente un 75 % del total de hormona T4 y un 70 % del total de hormona T3 circulantes (Refetoff y Larsen, 1989). Las alteraciones en este sistema se han relacionado con distintas osteoartropatías y miopatías observándose, por ejemplo, que los niveles bajos de la hormona T3 eran responsables de la rigidez muscular de estos pacientes (Nehls, 2018). Con anterioridad, algunos autores ya estudiaron el papel de la función tiroidea en pacientes de FM, demostrando que la estimulación de la síntesis de estas hormonas con una inyección de hormona liberadora de tirotrópina era mucho menos efectiva que en personas sanas (Neeck y Riedel, 1992). Otros trabajos posteriores demostraron que era habitual la presencia de tiroiditis autoinmune en

las pacientes de FM, pudiendo incluso influir en el desarrollo y la severidad de la patología (Bazzichi et al., 2007a; Suk et al., 2012). No obstante, hasta la fecha apenas se ha investigado el efecto del aceite en la función hormonal tiroidea, siendo el trabajo más concluyente el artículo de Mekircha y colaboradores (2018). Este grupo demostró, en un modelo murino expuesto a deltametrina (insecticida de uso extendido), que el aceite de oliva revertía a niveles normales diferentes marcadores de estrés oxidativo y de función tiroidea. Además, se ha demostrado que la oleuropeína, un fenol del AOVE, tiene efecto protector en líneas celulares de cáncer de tiroides, reduciendo los niveles de ERK y Akt fosforilados, así como los niveles de ERO (Bulotta et al., 2013). Sin embargo, no hemos podido comprobar por ELISA la reversión en los niveles de THBG en el plasma de las pacientes FMA. Esta circunstancia puede deberse, al igual que en ACTB, a las pequeñas ratios de diferencia observadas entre los grupos en el análisis nLC-MS/MS. En este contexto, y aunque sería necesario un análisis más detenido para confirmar los resultados, estos sugieren el efecto protector que el AOVE ejerce sobre el sistema endocrino a través de la regulación en los niveles de los transportadores de corticoides y tiroxina.

En definitiva, el análisis del perfil proteómico del plasma en FM realizado en esta tesis doctoral ha servido para confirmar la expresión diferencial de proteínas entre mujeres sanas y pacientes de FM. Dicha expresión diferencial afecta a procesos relacionados con la respuesta inflamatoria, el sistema inmunológico, la coagulación y el metabolismo lipídico. Por otro lado, el consumo de una dieta enriquecida en AOVE, logró normalizar los niveles de expresión de algunas proteínas relevantes de estas rutas.

V.2 DIFERENCIAS ASOCIADAS A LA FIBROMIALGIA EN EL PROTEOMA CELULAR DE FIBROBLASTOS DERMAL Y EFECTO DEL TRATAMIENTO CON HIDROXITIROSOLO

V.2.1 Diferencias asociadas a la fibromialgia en el proteoma celular de fibroblastos dermales

Una vez confirmados los cambios en el proteoma plasmático asociados a la FM, se procedió al estudio del modelo *in vitro* analizando las diferencias a nivel proteómico entre fibroblastos dermales primarios, procedentes de una mujer sana y de una paciente de FM. En el estudio por nLC-MS/MS del proteoma de ambos cultivos, el primero que se plantea en este

campo, se detectaron un total de 357 proteínas con expresión diferencial en FM: 154 con un nivel mayor y 203 con un nivel menor. Este elevado número de proteínas hizo aconsejable una primera aproximación mediante un análisis de los términos GO asociados a ellas utilizando la base de datos PANTHER (Britze et al., 2014). De este modo, se constató la alteración del metabolismo oxidativo (respiración aeróbica, ciclo de los ácidos tricarbóxicos, oxidación de compuestos orgánicos...), la despolimerización de filamentos de actina, diferenciación celular, transcripción, traducción y procesamiento de proteínas. Igualmente, se vieron alterados otros procesos estrechamente ligados al sistema músculo-esquelético como la diferenciación de condrocitos, la morfogénesis ósea, el propio desarrollo del sistema esquelético y la contracción muscular. De todos ellos, el término con mayor *fold enrichment* fue la **despolimerización de los filamentos de actina** con 3 proteínas elevadas: aducina alfa (ADDA), y las subunidades alfa-1 (CAZA1) y 2 (CAZA2) de la proteína de unión a actina F. La proteína ADDA actúa sobre los filamentos de actina, adhiriéndose a sus extremos para evitar su despolimerización (Kuhlman et al., 1996). Por otra parte, las proteínas CAZA1 y CAZA2 pertenecen al complejo proteico CapZ que se une a los extremos de los filamentos de actina para su ensamblaje (Kim et al., 2007). La despolimerización de los filamentos de actina es de vital importancia para la viabilidad celular, participando además en procesos como la migración celular, la citocinesis y la fisión mitocondrial (Ono, 2007; Bereiter-Hahn et al., 2008). Precisamente, el desequilibrio en la dinámica de los procesos de fusión/fisión mitocondrial se encuentra íntimamente vinculado a condiciones de estrés metabólico (Kuzmich et al., 2011) y podría explicar, al menos parcialmente, las alteraciones del metabolismo oxidativo descritas en FM (Cordero et al., 2010a; Cordero et al., 2010b; Favero et al., 2019). Este hecho concuerda con el incremento en los niveles de ERO detectado en las células de la paciente de FM y la alteración de rutas mitocondriales claves en el metabolismo energético celular como la β -oxidación y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos detectadas por IPA. La **β -oxidación de los ácidos grasos** consta de cuatro reacciones encadenadas en las que se van eliminando sucesivamente unidades de dos átomos de carbono en forma de acetyl-CoA. Los fibroblastos de la paciente de FM presentan un incremento en el nivel de expresión de cuatro proteínas de esta ruta: ECHA, ECHB, HCDH y THIM. ECHA y ECHB son subunidades de la proteína trifuncional mitocondrial, un complejo enzimático que cataliza las tres últimas reacciones de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (Izai et al., 1992). La actividad enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa reside en la subunidad α (ECHA) y la actividad

cetoacil-CoA tiolasa reside en subunidad β (ECHB; Kamijo et al., 1993). Por otra parte, en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta, las actividades 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y 3-cetoacil-CoA tiolasa son llevadas a cabo por las enzimas HCDH y THIM, respectivamente (Nelson y Cox, 2015). El acetil-CoA producido por la oxidación de ácidos grasos puede seguir catabolizándose en el **ciclo de los ácidos tricarboxílicos**. En este sentido, los fibroblastos de la paciente de FM también presentan un incremento en la expresión de cuatro proteínas de este ciclo: CISO, MDHM, ODO1, ODO2. En definitiva, todos los resultados anteriores confirman la alteración del metabolismo energético en FM. Igualmente, se modifican el **metabolismo de los ARN de transferencia, la traducción proteica (iniciación, elongación y terminación)** y el **transporte mediante vesículas desde el retículo endoplasmático (RE) al Golgi** donde continúa el proceso de maduración (glicosilación) de proteínas que posteriormente se anclan a membrana citoplasmática, forman parte de lisosomas o serán secretadas a la MEC. Todo lo anterior indica que la alteración en la síntesis y maduración proteica subyace en la fisiopatología de la FM.

Otros términos GO que destacan son aquellos vinculados al sistema músculo-esquelético: desarrollo del sistema esquelético, morfogénesis ósea, diferenciación de condrocitos y contracción muscular. El **desarrollo del sistema esquelético** y la **morfogénesis ósea** son, por definición, los procesos de formación, desarrollo y organización del esqueleto hasta la composición completa de su estructura. Muy vinculada a ellos se encuentra la ruta de **diferenciación de condrocitos**, células encargadas de formar el cartílago. La mayor parte de las proteínas de estas rutas pertenecen a la familia del colágeno (CO1A1, CO6A1, CO6A2, CO6A3, COCA1), todas disminuidas en FM. Las deficiencias en el colágeno se asocian, principalmente, a patologías del sistema músculo-esquelético. El colágeno I (CO1A1 y CO1A2) es el más abundante y supone el 90 % de la masa orgánica del hueso, aunque está en la práctica totalidad del tejido conectivo (tendones, fascia...), siendo el principal responsable de la conformación, integridad y resistencia del mismo (Gelse et al., 2003). La alteración en su síntesis se asocia a patologías como la osteogénesis imperfecta, en la que más del 90 % de los pacientes presentan mutaciones en los genes que codifican las cadenas tipo I del colágeno I (COL1A1, COL1A2; Gajko-Galicka, 2002). Los resultados de esta tesis reflejan una disminución de este colágeno acompañada de una mayor expresión de la MMP14, una metaloproteínasa que degrada el colágeno I y otras proteínas de la MEC, siendo clave en la homeostasis de la

misma (Overall, 2001; Tam et al., 2004; Zigrino et al., 2016). De hecho, y tal y como se discutió al analizar los resultados en plasma, la alteración en la dinámica de la MEC se vincula con trastornos inflamatorios agudos y crónicos (Korpos et al., 2009). En tejidos inflamados, la remodelación de la MEC se ve favorecida por la liberación de citoquinas como el TNF o el IFN- γ (Sorokin, 2010). Por otro lado, hay evidencias que señalan a los productos generados durante la degradación de la MEC como agentes proinflamatorios. Así, los fragmentos de elastina y de colágeno I activan la producción de citoquinas proinflamatorias (Weathington et al., 2006; Almine et al., 2013). Estas evidencias explican que la degradación de proteínas de la MEC pueda derivar en procesos patológicos como la artritis (Araki y Mimura, 2017), una enfermedad de tipo reumático que comparte algunos de sus síntomas con la FM. En la MEC, el colágeno I se asocia con el colágeno VI un tipo de colágeno ampliamente distribuido en el organismo, que disminuye en los fibroblastos dermales de FM (CO6A2, CO6A3, CO6A1), y que resulta especialmente útil en la preservación de la integridad del cartílago articular y del hueso (Gelse et al., 2003). Sus alteraciones subyacen a un gran número de patologías (Lamandé y Bateman, 2018) como la osteoartritis (Nugent et al., 2009), una afección comórbida con la FM (Argoff et al., 2016) en la que se han encontrado indicios de apoptosis en los condrocitos del cartílago articular (Musumeci et al., 2015). Igualmente, se han descrito mutaciones en el gen de este colágeno asociadas con la disminución o ausencia total de esta proteína en miopatías como la de Bethlem o la de Ullrich, que conllevan alteraciones en piel y tendones (Camacho Vanegas et al., 2001; Zamurs et al., 2015). Estas miopatías aparecen con asiduidad acompañadas de patologías del tejido conectivo similares al síndrome de Ehlers-Danlos (Chiquet et al., 2014), una enfermedad rara causada por déficits en la síntesis de colágeno que afecta a la piel, articulaciones y vasos sanguíneos (Parapia y Jackson, 2008). La variante clasificada como síndrome de Ehlers-Danlos de tipo hiper móvil se acompaña de dolor articular, ansiedad, depresión, insomnio y fatiga crónica (Tinkle et al., 2009), síntomas muy característicos de la FM. En esta línea, Hermanns-Lê, Piérard y Angenot (2013) ya sugirieron la posibilidad de que la FM fuera una variante no catalogada del síndrome de Ehlers-Danlos de tipo hiper móvil. La disminución de colágeno I y VI observada en nuestro estudio proteómico se corroboró por western blot, confirmándose así la implicación de estas proteínas en la patología. Por último, mutaciones en el gen del colágeno XII (*COL12A1*) asociadas con una menor expresión proteica, al igual que ocurre en los fibroblastos de FM (COCA1), también se han relacionado con la aparición de este síndrome y de una miopatía

similar a la de Ulrich. (Hicks et al., 2014; Zou et al., 2014). La principal función de este colágeno es la organización de fibrillas de colágeno tipo I (Chiquet et al., 2014), así como la correcta diferenciación de osteoblastos a osteocitos, para asegurar una osteogénesis adecuada (Izu et al., 2011). Todos estos resultados reafirman el papel clave que una homeostasis correcta de la MEC desempeña en la patogenia de la FM. Precisamente, uno de los elementos esenciales en la interacción células-MEC son las integrinas, proteínas que actúan como puente entre la MEC y la actina del citoesqueleto. La **señalización de la quinasa ligada a integrina (ILK)** fue una de las rutas moleculares con valor Z negativo en nuestro estudio (-2,14), indicando su inhibición en los fibroblastos procedentes de FM. En esta ruta, hay un total de 16 proteínas afectadas, 4 de ellas con niveles de expresión elevados (CDC42, ITB1, PTPA, VIME) y 12 (ACTB, COF1, COF2, CTNB1, FINC, FLNC, MYH9, MYL6, MYL9, MYPT1, NACAM, PARVA) con niveles de expresión reducida. Las integrinas participan en procesos de señalización célula-MEC de forma bidireccional: coordinan los procesos internos que regulan la adhesión celular al entorno y procesan las señales que este entorno envía a la célula (Boppart y Mahmassani, 2019). En el caso de la comunicación desde dentro hacia afuera, la unión de moléculas como la talina a la subunidad β de las integrinas provoca un cambio conformacional en estas últimas (Boppart y Mahmassani, 2019) que facilita la unión a proteínas de la MEC como la laminina, el colágeno o la fibronectina (Lee et al., 1995). Precisamente, el análisis proteómico reflejó una importante disminución en los fibroblastos de FM de talina, colágeno y fibronectina, las dos últimas validadas mediante ELISA. En la dirección contraria, la señalización de ILK, a través de la reorganización de la actina, regula múltiples procesos celulares como la proliferación, la supervivencia y la movilidad (Brakebusch y Fassler, 2003; Juliano et al., 2004; Yen et al., 2014). En este sentido, proteínas como Cdc42, actina citoplasmática, miosina y cofilina tienen una expresión diferencial en los fibroblastos de FM, aunque no hemos podido corroborar la disminución de esta última mediante ELISA. Cdc42 pertenece a la familia de GTPasas Rho (Gilcrease, 2007) que controlan la reorganización de la actina en la célula mediante la fosforilación indirecta de la miosina y cofilina (Sumi et al., 1999; Schmitz et al., 2000). Por tanto, estos resultados vuelven a incidir en la hipótesis de la existencia de alteraciones del citoesqueleto y de las uniones célula-MEC en las enfermas de FM.

Tal y como se mencionó con anterioridad, el último término GO relacionado con el sistema músculo-esquelético fue la **contracción muscular** con 8 proteínas alteradas: 2 con

niveles de expresión elevados en FM (KGP1, KAPCA) y 6 (CNN2, CNN3, CRYAB, MYL6, MYL9, TAGL) con niveles de expresión reducidos. Las dos primeras proteínas pertenecen a la familia de quinasas AGC, encargadas de regular procesos celulares tan diversos como el metabolismo, la división celular o el desarrollo (Turnham y Scott, 2016). En fibroblastos dermales, Bae y colaboradores (2014) demostraron que el NO producido en este tipo celular era capaz de estimular, a través de su interacción con la quinasa KGP1, los canales de K⁺. La autoinmunidad que algunas personas desarrollan frente a estos canales provoca hiperexcitabilidad neuronal que conlleva la aparición de dolor crónico (Klein et al., 2012). El gran número de procesos en los que participan estos canales han provocado que se hayan utilizado como potenciales dianas terapéuticas en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas o en la propia FM (Bae et al., 2014; Lawson, 2016). Otras proteínas anotadas en este término GO, como las calponinas 2 y 3 (Hossain et al., 2005; Shibukawa et al., 2013) y la ya mencionada miosina participan, además de en la contracción muscular, en la reordenación del citoesqueleto de actina y vienen a confirmar la alteración del citoesqueleto en los fibroblastos de FM.

Por último, el análisis IPA señala como inhibida la **ruta de señalización de GP6**. No obstante, GP6 es un receptor del colágeno que solo se expresa en plaquetas promoviendo su agregación (Nieswandt y Watson, 2003; Furie y Furie, 2008). Por tanto, este resultado carece de sentido biológico en el cultivo de fibroblastos, aunque se explica por la bajada generalizada de colágeno, ya comentada. No obstante, en caso de confirmarse la activación de esta ruta en las plaquetas de las pacientes de FM, concordaría con la activación plaquetaria descrita por Milovanovic y colaboradores (2016) en la patología y comentada en la discusión del perfil proteómico del plasma.

V.2.2 Efecto del tratamiento con hidroxitirosol sobre el proteoma celular de fibroblastos dermales

Tras haber demostrado el efecto regulador del AOVE en el proteoma plasmático de las pacientes de FM, y considerando la acción antioxidante y antiinflamatoria del HT, se procedió a estudiar el posible efecto de este fenol en el proteoma de fibroblastos dermales.

Inicialmente, se evaluó la capacidad antioxidante del HT sobre los fibroblastos (48 h de tratamiento en un rango de concentraciones no citotóxicas). Este fenol ejerció una leve acción

antioxidante en el cultivo de FM. Coincidiendo con estos resultados, Warleta y colaboradores (2011) habían comprobado en células de cáncer de mama que el HT ejercía su capacidad antioxidante tras la adición de peróxido de hidrógeno al cultivo y no en condiciones basales. Por tanto, el hecho de que este fenol únicamente ejerza efecto antioxidante en las células procedentes de la paciente de FM podría responder al mayor nivel de estrés oxidativo que estas presentan. Igualmente, Avola y colaboradores (2019) han observado que en fibroblastos dermales el HT es capaz de prevenir el daño oxidativo tras radiación ultravioleta.

A continuación, se estudió el efecto del tratamiento con HT (1,5 μ M durante 48 h) sobre el proteoma de los fibroblastos dermales. La elección de la concentración de HT fue similar a la alcanzada en sangre con una dieta cuya única fuente de grasa en forma de aceite era el AOVE (Oliveras-López et al., 2013). Los resultados indican que este tratamiento modifica el doble de proteínas en células procedentes de la mujer sana (73) que en aquellas de la paciente de FM (33). Este hecho podría deberse a la disminución en la transcripción y traducción señalada en las células de FM con el análisis PANTHER (apartado IV.2.1.2 de resultados).

El análisis proteómico se centró en aquellas proteínas que tras el tratamiento con HT (FM+HT) mostraban niveles similares a los de células sanas. Así, se detectaron un total de 91 proteínas indexadas en distintas rutas moleculares. Según el análisis IPA la de mayor significación estadística, con un total de 9 proteínas revertidas por el HT (ACTB, ARF6, ARPC1B, CLIP1, CTNNA1, CTNNB1, TUBB6, TUBB, ZYX; la CTNNB1 confirmada mediante ELISA) fue la **remodelación de las uniones epiteliales adherens** (fig. 37), típicamente asociadas a las células epiteliales, aunque también forman parte de la conexión intercelular entre fibroblastos (El Sayegh et al., 2007). Trujillo y colaboradores (2016) comprobaron que la curcumina, un compuesto fenólico procedente de la cúrcuma, es capaz de proteger la integridad de las uniones adherens entre células. Sin embargo, apenas se ha investigado el efecto protector de los fenoles del aceite en las mismas, aunque Pirozzi y colaboradores (2016) sí demostraron la acción reparadora del HT sobre la integridad de la barrera intestinal en un modelo murino. Por otra parte, se ha confirmado la relación entre el desgaste en la barrera epitelial del intestino y patologías inflamatorias como la enfermedad de Crohn (Groschwitz y Hogan, 2009) y la propia FM (Goebel et al., 2008). Por tanto, la confirmación en otros tipos celulares del

efecto beneficioso del HT en la alteración de las uniones adherens epiteliales podría respaldar su utilización como agente terapéutico en FM.

El estudio con la base de datos KEGG mostró que las proteínas reguladas por el tratamiento con HT participaban en (i) rutas metabólicas, (ii) el procesamiento de proteínas en el RE; (iii) la regulación del citoesqueleto de actina, (iv) la termogénesis, y (v) los proteoglucanos. Estos procesos ya se habían tratado, de forma directa o indirecta, al evaluar los cambios asociados a la FM en el perfil proteico del modelo *in vitro*.

Respecto a las **rutas metabólicas** destaca la normalización de 8 proteínas implicadas en: la fosforilación oxidativa (subunidad f, ATPK, y la subunidad B1, AT5F1, del complejo F₀ de la ATP sintasa), el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (citrato sintasa, CISY), el metabolismo del grupo hemo (Biliverdina reductasa A, BIEA), la síntesis de nucleótidos (Tetrahidrofolato sintasa C1, C1TC; sintetasa de adenilosuccinato, PURA2; Transaldolasa, TALDO), la maduración de proteínas (subunidad catalítica del complejo enzimático oligosacaril transferasa, STT3B), el metabolismo glucídico (glutamina fructosa-6-fosfato transaminasa, GFPT1; enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, GLGB; glucosa 6-fosfato isomerasa, G6PI) y lipídico (3-oxoacil-coA deshidrogenasa de cadena muy larga, DHB12). En su conjunto, estos resultados podrían confirmar que el tratamiento con este fenol contribuiría a contrarrestar las alteraciones metabólicas asociadas a la FM. Algunos de estos efectos ya han sido descritos con anterioridad en modelos murinos (Zheng et al., 2015) y de células endoteliales humanas (Calabriso et al., 2018).

En la ruta de **procesamiento de proteínas en el RE** aparecen un total 8 proteínas normalizadas por el tratamiento (CRYAB, DNAJA2, ERO1A, E2AK2, SC23A, SC31A, STT3B, SAR1A). Este orgánulo es uno de los de mayor tamaño celular, encargado de la síntesis, ensamblaje y maduración de más de un tercio de las proteínas de la célula (Anelli y Sitia, 2008). Cuando las proteínas mal plegadas comienzan a acumularse en el RE, este se ve sometido a un fuerte estrés que intenta paliar mediante la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas. La inflamación agrava el estrés del retículo (Rozpędek et al., 2016). Por tanto, la normalización tras tratamiento con HT de proteínas de esta ruta como E2AK2 (quinasa que fosforila al factor eucariota 2 α de iniciación de la traducción inhibiendo la síntesis proteica; ratio FM/SANAS = 1,57) y ERO1A (proteína alfa similar a la oxirreductasa endoplásmica 1 que participa en la formación de puentes disulfuro durante el ensamblaje de proteínas en el

RE (Cabibbo et al., 2000; ratio FM/SANAS = 2,13) indican que el estrés al que está sometido el RE en FM podría ser revertido por el tratamiento con HT. De hecho, el efecto beneficioso del HT y sus derivados sobre el estrés del RE se ha investigado en células de hepatocarcinoma humano (Giordano et al., 2014) y en modelos animales (Wang et al., 2018) comprobándose la capacidad del mismo de influir en esta ruta. Además, y según se aprecia en el esquema KEGG (fig. 39), el tratamiento con HT normaliza la expresión de proteínas participantes en el complejo COPII, restableciendo el normal funcionamiento de la señalización RE – aparato de Golgi, proceso que como ya se ha mencionado se altera en las células de FM.

El tratamiento con HT en las células procedentes de la paciente de FM también normalizó la expresión de 5 proteínas involucradas en la **regulación del citoesqueleto de actina** (ACTB, ARC1B, COF1, COF2, MYPT1), uno de los procesos más afectados por la patología en el modelo *in vitro* de fibroblastos dermales. El efecto del HT sobre el citoesqueleto de actina no se ha estudiado hasta la fecha, existiendo solo algún trabajo centrado en otros polifenoles como el resveratrol, capaz de alterar la organización de esta estructura (Azios et al., 2007). Como ya se comentaba anteriormente, el citoesqueleto de actina juega un papel clave en el anclaje celular a la MEC, que también se encuentra afectada en las células de FM. En este sentido, otro proceso regulado por el tratamiento con HT es la **ruta de los proteoglucanos**, con 5 proteínas normalizadas (ACTB, CD63, CTNB1, MYPT1, KAPCA). Los proteoglucanos son macromoléculas de la superficie celular o de la MEC en las que una o más cadenas de glucosaminoglucanos están unidas covalentemente a una proteína de membrana o a una proteína de secreción (Nelson y Cox, 2015), siendo el componente glucosídico el mayoritario. Estas moléculas están implicadas en el desarrollo de multitud de patologías, la mayoría íntimamente ligadas al sistema músculo-esquelético. Así, se han detectado mutaciones en genes codificantes de proteoglucanos causantes de enfermedades como el síndrome de Schwartz Jampel (Arikawa-Hirasawa et al., 2002), caracterizado por debilidad muscular y rigidez articular, o la osteocondritis disecante, alteración articular con degradación ósea y de la MEC que cursa con fuertes dolores (Stattin et al., 2010). Tal es la importancia de estas macromoléculas en el organismo que se han llegado a proponer como biomarcadores en suero para distintas enfermedades inflamatorias como la osteoartritis, la artritis reumatoide o la propia FM (Mehraban et al., 1991; Mertoglu et al., 2018). Entre las proteínas reguladas por el tratamiento con HT en los fibroblastos de la paciente se detectó el receptor CD63 (ratio

FM/SANAS = 2,14), proteína participante en la señalización por ILK, ruta afectada en el cultivo procedente de la paciente de FM. Esta ruta es necesaria para el anclaje celular a la MEC y la señalización molecular entre ambas (Boppart y Mahmassani, 2019). Este resultado coincide con lo ya descrito por García-Vilas y colaboradores (2017), quienes demostraron en cultivos de células endoteliales el papel inhibitor de este fenol en la remodelación de la MEC. No obstante, sería necesario profundizar en el mecanismo de acción del HT sobre el metabolismo de la MEC y su vínculo con su efecto antiinflamatorio.

El análisis con KEGG de las proteínas revertidas por el HT en FM (fig. 41) también destacó la **ruta de termogénesis**, con 5 proteínas participantes en ella normalizadas con el tratamiento (ACTB, ATPK, AT5F1, KAPCA, KGP1). Las quinasas KAPCA y KGP1, elevadas en FM e indexadas en el proceso de contracción muscular fueron discutidas anteriormente, indicando su participación en múltiples procesos (Turnham y Scott, 2016). Esta ruta metabólica se lleva a cabo, principalmente, en el tejido adiposo marrón para controlar la termorregulación mediante la producción de calor (Guyton et al., 1971). El proceso de control térmico es poco eficiente en las enfermas de FM (Larson et al., 2014). Así, aunque la sobreactivación del sistema nervioso simpático en FM agrava el dolor, iniciando una termogénesis adaptativa, esta no consigue restablecer la temperatura corporal. De hecho, estas pacientes presentan habitualmente una temperatura anormalmente baja, principalmente en torno a los puntos gatillo, que se ha vinculado con el dolor en estas zonas (Jeschonneck et al., 2000). El reparto de estos puntos gatillo coincide en gran parte con los depósitos de tejido adiposo marrón (Wolfe, 1990; Larson et al., 2014). Por otra parte, los estímulos que activan la termogénesis, como el estrés o el frío, también empeoran los síntomas de la FM (Kuroshima et al., 1984; Julien et al., 2005). Una hipótesis que podría explicar el mal funcionamiento de este proceso en FM es la interacción entre la MEC y los receptores celulares de los adipocitos del tejido adiposo marrón (Li et al., 2019). Como ya se ha mencionado, la integridad de la MEC en la FM estaría seriamente comprometida este proceso dificultando una termogénesis eficaz. Por otra parte, en el trabajo de Li y colaboradores (2019), los adipocitos fueron estimulados con forskolina, un compuesto vegetal que se utiliza habitualmente en el estudio de las rutas de señalización dependientes de AMPc (Seale et al., 2008). Esta estimulación se tradujo en un aumento de proteínas relacionadas con la MEC y del coactivador PGC-1 α . Este coactivador transcripcional ya se había postulado como

uno de los principales responsables de la activación de la termogénesis en el tejido adiposo marrón, además de ser uno de los genes más relevantes en la ruta de señalización de biogénesis mitocondrial (Puigserver y Spiegelman, 2003). No obstante, la proteína PGC-1 α no modifica su expresión en células de FM ni tras su tratamiento con HT. De hecho, nuestros resultados preliminares (no mostrados) reflejan una menor expresión basal de este gen en FM que incluso disminuye tras el tratamiento con HT.

En definitiva, el análisis proteómico comparado de los cultivos procedente de una mujer sana y de una enferma de FM señala la alteración en la homeostasis de la MEC y su posible papel en el estado proinflamatorio asociado a la patología que podría ser revertido, al menos parcialmente, por el efecto del HT.

VI.CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El análisis proteómico mediante nLC-MS/MS, realizado por primera vez en el plasma de pacientes de FM, corrobora la importancia del estrés oxidativo y la inflamación en esta patología implicando procesos como la coagulación y el metabolismo lipídico.
2. El papel normalizador del AOVE sobre los procesos anteriores se manifiesta con tan solo 3 semanas de ingesta y sugiere su utilidad en el abordaje terapéutico de la FM.
3. El estudio en fibroblastos dermales coincide en señalar al estrés oxidativo como un proceso clave en la etiopatogenia de la FM.
4. El análisis proteómico mediante nLC-MS/MS, realizado por primera vez en fibroblastos dermales, señala al desajuste de la MEC y del metabolismo oxidativo como principales responsables de la inflamación asociada a la FM.
5. El HT administrado al cultivo de fibroblastos dermales a una concentración alcanzable en sangre con la ingesta de AOVE es capaz de revertir, al menos parcialmente, el estado proinflamatorio asociado a la FM.

VII.ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza: El estudio del estrés oxidativo es una práctica frecuente en la actualidad debido a que suele relacionarse con multitud de patologías. Así, se admite que la aparición de radicales libres, que son elementos que alteran el perfil oxidativo de las personas, forman parte de la etiología de patologías como el Alzheimer, el Parkinson, la aterosclerosis y/o el propio envejecimiento celular. Recientes investigaciones también relacionan al estrés oxidativo con la patogenia de la Fibromialgia. Hasta el momento, no existe un tratamiento efectivo para esta patología, aunque se suelen obtener mejores resultados si el tratamiento es multidisciplinar, sustentándose en ejercicio, psicoterapia y fármacos. Debido a su carácter oxidativo, últimamente, se barajan también medidas higiénico-dietéticas para su abordaje terapéutico, suplementado la dieta diaria con nutrientes de acción antioxidante.

El aceite de oliva (AO), integrante básico de la dieta mediterránea, no es sólo una grasa rica en ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), sino que también destaca por su contenido en compuestos con elevada capacidad antioxidante y antiinflamatoria.

En base a lo anteriormente expuesto, este proyecto propone realizar un ensayo clínico de intervención nutricional. Dicha intervención consistirá en la administración a pacientes diagnosticados de Fibromialgia de tres tipos de aceites de oliva que difieren entre sí en la concentración de compuestos con actividad antioxidante. Tras el periodo de intervención nutricional, se valorará el efecto que cada tipo de aceite haya ejercido sobre los marcadores oxidativos e inflamatorios de las pacientes y se comprobará si existe correlación con las manifestaciones clínicas más relevantes de esta patología.

Importancia: Con el presente proyecto, se pretende profundizar más en la etiopatogenia de la Fibromialgia. En muestras sanguíneas de pacientes afectados de esta patología, de obtención fácil y segura, se podrá valorar los marcadores oxidativos y las posibles variaciones que estos puedan sufrir tras la intervención dietética. Así mismo, se abre el abanico del tratamiento multidisciplinar de esta patología con la aplicación de medidas higiénico-dietéticas.

Los pacientes que participen en este proyecto recibirán apoyo asistencial por parte de personal clínico especializado, que podrá valorar el curso de su patología y los cambios que la intervención dietética pueda ocasionar en la misma.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

No se conocen, en la actualidad, otras alternativas menos invasivas que la extracción de sangre para la determinación completa del perfil oxidativo del paciente. El análisis en la saliva es una técnica aún incipiente y que no permite la determinación de todos los parámetros que se presentan en el estudio.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con M^a Luisa del Moral Leal en el teléfono: 953 212761 y 661411447o en el correo electrónico:mlmoral@ujaen.es

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

FIBROMIALGÍA Y ESTRÉS OXIDATIVO. INFLUENCIA DEL ACEITE DE OLIVA.

Yo _____ (Nombre _____ y Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)

He podido hacer preguntas sobre el estudio **FIBROMIALGÍA Y ESTRÉS OXIDATIVO. INFLUENCIA DEL ACEITE DE OLIVA.**

He recibido suficiente información sobre el estudio **FIBROMIALGÍA Y ESTRÉS OXIDATIVO. INFLUENCIA DEL ACEITE DE OLIVA.**

- He hablado con el profesional sanitario informador:

- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado <TÍTULO>*

Firma del paciente
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional
sanitario informador

Nombre y apellidos:.....
Fecha:

Nombre y apellidos:
Fecha:



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Vicerrectorado de Investigación,
Desarrollo Tecnológico e Innovación

Comité de Bioética

- Informe -

Tipo de actividad: Investigadora – proyecto de investigación.

Título de la actividad: Fibromialgia y estrés oxidativo. Influencia del aceite de oliva

Convocatoria y/o entidad a la que se presenta: Junta de Andalucía.

Investigador principal: Del Moral Leal, M^a Luisa.

Departamento: Biología Experimental.

Tipo de documentación examinada: Memoria del proyecto y formulario.

Tipo de experimentación o actividad sometida a informe: Experimentación con muestras de origen biológico.

Informe que se emite: Favorable, siempre y cuando se obtenga la autorización de los correspondientes Complejos Hospitalarios.

Jaén, 10 de febrero de 2010



María de los Ángeles Peinado Herreros
Vicerrectora de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación

ANEXO 3

Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) Versión en español

INSTRUCCIONES: En las preguntas que van de la a a la i, por favor rodee con un círculo el número que mejor describa cómo se encontró en general durante la última semana. Si no tiene costumbre de realizar alguna de las siguientes actividades, tache la pregunta.

1. Ha sido usted capaz de:

	Siempre	La mayoría de las veces	En ocasiones	Nunca
a. Hacer la compra	0	1	2	3
b. Hacer la colada con lavadora	0	1	2	3
c. Preparar la comida	0	1	2	3
d. Lavar los platos y los cacharros de la cocina a mano	0	1	2	3
e. Pasar la fregona, la mopa o la aspiradora	0	1	2	3
f. Hacer las camas	0	1	2	3
g. Caminar varias manzanas	0	1	2	3
h. Visitar a amigos / parientes	0	1	2	3
i. Utilizar transporte público	0	1	2	3

2. ¿Cuántos días de la última semana se sintió bien?

0 1 2 3 4 5 6 7

3. ¿Cuántos días de la última semana faltó usted al trabajo por causa de su fibromialgia? (Si no trabaja usted fuera de casa, deje esta pregunta en blanco)

0 1 2 3 4 5

(En las siguientes preguntas, ponga una marca como esta | en el punto de la línea que mejor indique cómo se sintió en general durante la última semana)

4. Cuando fue a trabajar, ¿cuánta dificultad le causaron el dolor u otros síntomas de su fibromialgia en el desempeño de su trabajo?

Sin Mucha
problema dificultad

5. ¿Cómo ha sido de fuerte el dolor?

Sin Dolor
dolor muy fuerte

6. ¿Cómo se ha encontrado de cansada?

Nada Muy
cansada cansada

7. ¿Cómo se ha sentido al levantarse por las mañanas?

Bien. Muy cansada

8. ¿Cómo se ha notado de rígida o agarrotada?

Nada Muy
rígida rígida

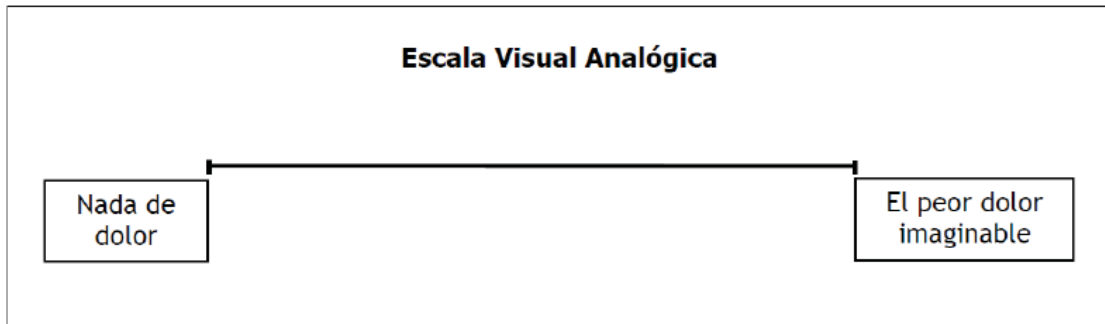
9. ¿Cómo se ha notado de nerviosa, tensa o angustiada?

Nada Muy
nerviosa nerviosa

10. ¿Cómo se ha sentido de deprimida o triste?

Nada Muy
Deprimida deprimida

EVA



CUESTIONARIO DE SALUD SF-12

INSTRUCCIONES: Las preguntas que siguen se refieren a lo que usted piensa sobre su salud. Sus respuestas permitirán saber como se encuentra usted y hasta qué punto es capaz de hacer sus actividades habituales. Por favor, conteste cada pregunta marcando una casilla. Si no está seguro/a de cómo responder a una pregunta, por favor, conteste lo que le parezca más cierto.

1. En general, usted diría que su salud es:

1	2	3	4	5
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Excelente	Muy buena	Buena	Regular	Mala

Las siguientes preguntas se refieren a actividades o cosas que usted podría hacer en un día normal. Su salud actual, ¿le limita para hacer esas actividades o cosas? Si es así, ¿cuánto?

	1 Sí, me limita mucho	2 Sí, me limita un poco	3 No, no me limita nada
2. Esfuerzos moderados , como mover una mesa, pasar la aspiradora, jugar a los bolos o caminar más de 1 hora	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Subir varios pisos por la escalera	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Durante **las 4 últimas semanas**, ¿ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, **a causa de su salud física**?

	1 Sí	2 No
4. ¿Hizo menos de lo que hubiera querido hacer?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. ¿Tuvo que dejar de hacer algunas tareas en su trabajo o en sus actividades cotidianas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Durante **las 4 últimas semanas**, ¿ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, **a causa de algún problema emocional** (como estar triste, deprimido, o nervioso)?

	1 Sí	2 No
6. ¿Hizo menos de lo que hubiera querido hacer, por algún problema emocional ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. ¿No hizo su trabajo o sus actividades cotidianas tan cuidadosamente como de costumbre, por algún problema emocional ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

8. Durante **las 4 últimas semanas**, ¿hasta qué punto **el dolor** le ha dificultado su trabajo habitual (incluido el trabajo fuera de casa y las tareas domésticas)?

1	2	3	4	5
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nada	Un poco	Regular	Bastante	Mucho

Las preguntas que siguen se refieren a cómo se ha sentido y cómo le han ido las cosas durante las **4 últimas semanas**. En cada pregunta responda lo que se parezca más a cómo se ha sentido usted. Durante las **4 últimas semanas** ¿cuánto tiempo...

	1 Siempre	2 Casi siempre	3 Muchas veces	4 Algunas veces	5 Sólo alguna vez	6 Nunca
9. ...se sintió calmado y tranquilo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. ...tuvo mucha energía?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. ...se sintió desanimado y triste?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

12. Durante las **4 últimas semanas**, ¿con qué frecuencia la salud física o los problemas emocionales le han dificultado sus actividades sociales (como visitar a los amigos o familiares)?

1	2	3	4	5
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Siempre	Casi	Algunas siempre	Sólo veces	Nunca alguna vez



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Vicerrectorado de Investigación

COMISIÓN DE ÉTICA

Tipo de actividad: LÍNEA EXPERIMENTAL.

Referencia: CEIOMGAB-210114-1

Título de la actividad: “Implicación del coactivador PGC1-alpha en la biogénesis mitocondrial en fibroblastos de pacientes de Fibromialgia. Posible de la influencia del hidroxitirosol (HT)”

Convocatoria y/o entidad a la que se presenta (si procede):

Investigador principal/Tutor/Director: Eva Siles Rivas.

Tipo de documentación examinada: Impreso de solicitud al Comité de Ética en Investigación con OMGs y ABs de la Universidad de Jaén.

Tipo de experimentación o actividad sometida a informe:


Valorar el posible papel protector del HT frente al daño oxidativo en cultivo primario de fibroblasto de pacientes de fibromialgia, a través de la estimulación de la biogénesis mitocondrial.

Líneas celulares humanas establecidas: Cultivo celular primario de fibroblastos humanos

Informe que se emite (Favorable /Desfavorable): **Favorable** de acuerdo a las condiciones de seguridad y confinamiento indicados en la memoria (laboratorio de cultivos celulares del CICT) y exclusivamente para esas líneas celulares indicadas.

Jaén, 28 de Marzo de 2019




Gustavo Reyes del Paso
Presidente Comisión de Ética

VIII.BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Ablin, J., Neumann, L., Buskila, D. (2008). Pathogenesis of fibromyalgia - a review. *Joint Bone Spine*, 75(3):273-279. doi:10.1016/j.jbspin.2007.09.010
2. Akobeng, A. K. (2007). Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatr*, 96(5):644-647. doi:10.1111/j.1651-2227.2006.00178.x
3. Almine, J. F., Wise, S. G., Hiob, M., Singh, N. K., Tiwari, K. K., Vali, S., et al. (2013). Elastin sequences trigger transient proinflammatory responses by human dermal fibroblasts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(9):3455-3465. doi:10.1096/fj.13-231787
4. Alok, R., Das, S. K., Agarwal, G. G., Salwahan, L., Srivastava, R. (2011). Relationship of severity of depression, anxiety and stress with severity of fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol*, 29(6 Suppl 69):3.
5. Altindag, O., Celik, H. (2006). Total antioxidant capacity and the severity of the pain in patients with fibromyalgia. *Redox Rep*, 11(3):131-135. doi:10.1179/135100006x116628
6. Amel Kashipaz, M. R., Swinden, D., Todd, I., Powell, R. J. (2003). Normal production of inflammatory cytokines in chronic fatigue and fibromyalgia syndromes determined by intracellular cytokine staining in short-term cultured blood mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 132(2):360-365. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02149.x
7. Amor, A. J., Serra-Mir, M., Martinez-Gonzalez, M. A., Corella, D., Salas-Salvado, J., Fito, M., et al. (2017). Prediction of Cardiovascular Disease by the Framingham-REGICOR Equation in the High-Risk PREDIMED Cohort: Impact of the Mediterranean Diet Across Different Risk Strata. *J Am Heart Assoc*, 6(3). doi:10.1161/jaha.116.004803
8. Anderson-Vasquez, H. E., Pérez-Martinez, P., Ortega Fernández, P., Wanden-Berghe, C. (2015). Impact of the consumption of a rich diet in butter and its replacement for a rich diet in extra virgin olive oil on anthropometric, metabolic and lipid profile in postmenopausal women. *Nutricion Hospitalaria*, 31(6):2561-2570. doi:10.3305/nh.2015.31.6.8732
9. Anelli, T., Sitia, R. (2008). Protein quality control in the early secretory pathway. *The EMBO journal*, 27(2):315-327. doi:10.1038/sj.emboj.7601974
10. Araki, Y., Mimura, T. (2017). Matrix Metalloproteinase Gene Activation Resulting from Disordered Epigenetic Mechanisms in Rheumatoid Arthritis. *International journal of molecular sciences*, 18(5):905. doi:10.3390/ijms18050905
11. Argoff, C. E., Emir, B., Whalen, E., Ortiz, M., Pauer, L., Clair, A. (2016). Pregabalin Improves Pain Scores in Patients with Fibromyalgia Irrespective of Comorbid Osteoarthritis. *Pain Med*, 17(11):2100-2108. doi:10.1093/pm/pnw098
12. Arikawa-Hirasawa, E., Le, A. H., Nishino, I., Nonaka, I., Ho, N. C., Francomano, C. A., et al. (2002). Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet*, 70(5):1368-1375. doi:10.1086/340390
13. Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., et al. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1):79-83. doi:10.1006/bbrc.1999.0255
14. Arnold, L. M., Bennett, R. M., Crofford, L. J., Dean, L. E., Clauw, D. J., Goldenberg, D. L., et al. (2018). AAPT Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. *J Pain*. doi:10.1016/j.jpain.2018.10.008
15. Asociación Médica Mundial. (2001). World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Bulletin of the World Health Organization*, 79(4):373.
16. Assasi, N., Blackhouse, G., Campbell, K., Hopkins, R. B., Levine, M., Richter, T., et al. (2015). Comparative Value of Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) and C-Reactive Protein (CRP) Testing in Combination Versus Individually for the Diagnosis of Undifferentiated Patients With Suspected Inflammatory Disease or Serious Infection: A Systematic Review and Economic Analysis, Edición 2015/12/19. Ottawa Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health.

17. Atzeni, F., Talotta, R., Masala, I. F., Giacomelli, C., Conversano, C., Nucera, V., et al. (2019). One year in review 2019: fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol*, 37 Suppl 116(1):3-10.
18. Aугuie, B. (2017). gridExtra: Miscellaneous Functions for "Grid" Graphics.
19. Avola, R., Graziano, A. C. E., Pannuzzo, G., Bonina, F., Cardile, V. (2019). Hydroxytyrosol from olive fruits prevents blue-light-induced damage in human keratinocytes and fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6):9065-9076. doi:10.1002/jcp.27584
20. Azios, N. G., Krishnamoorthy, L., Harris, M., Cubano, L. A., Cammer, M., Dharmawardhane, S. F. (2007). Estrogen and resveratrol regulate Rac and Cdc42 signaling to the actin cytoskeleton of metastatic breast cancer cells. *Neoplasia*, 9(2):147-158. doi:10.1593/neo.06778
21. Bae, H., Lee, H. J., Kim, K., Kim, J. H., Kim, T., Ko, J. H., et al. (2014). The stimulating effects of nitric oxide on intermediate conductance Ca(2)(+)-activated K(+) channels in human dermal fibroblasts through PKG pathways but not the PKA pathways. *Chinese Journal of Physiology*, 57(3):137-151. doi:10.4077/cjp.2014.bab171
22. Bak, M. J., Furmanski, P., Shan, N. L., Lee, H. J., Bao, C., Lin, Y., et al. (2018). Tocopherols inhibit estrogen-induced cancer stemness and OCT4 signaling in breast cancer. *Carcinogenesis*. doi:10.1093/carcin/bgy071
23. Balanescu, P., Ladaru, A., Balanescu, E., Baicus, C., Dan, G. A. (2014). Systemic sclerosis biomarkers discovered using mass-spectrometry-based proteomics: a systematic review. *Biomarkers*, 19(5):345-355. doi:10.3109/1354750x.2014.920046
24. Balducci, V., Incerpi, S., Stano, P., Tofani, D. (2018). Antioxidant activity of hydroxytyrosyl esters studied in liposome models. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860(2):600-610. doi:10.1016/j.bbmem.2017.11.012
25. Baralla, A., Fois, A. G., Sotgiu, E., Zinellu, E., Mangoni, A. A., Sotgia, S., et al. (2018). Plasma Proteomic Signatures in Early Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proteomics Clin Appl*, 12(3):e1700088. doi:10.1002/prca.201700088
26. Barallobre-Barreiro, J., Chung, Y.-L., Mayr, M. (2013). La proteómica y la metabolómica: los mecanismos de la enfermedad cardiovascular y el descubrimiento de biomarcadores. *Revista Española de Cardiología*, 66(08):657-661.
27. Barceló-Martínez, E., Gelves-Ospina, M., Navarro Lechuga, E., Allegri, R. F., Orozco-Acosta, E., Benítez-Agudelo, J. C., et al. (2018). Serum cortisol levels and neuropsychological impairments in patients diagnosed with Fibromyalgia. *Actas Esp Psiquiatr*, 46(1):1-11.
28. Baron, R., Perrot, S., Guillemin, I., Alegre, C., Dias-Barbosa, C., Choy, E., et al. (2014). Improving the primary care physicians' decision making for fibromyalgia in clinical practice: development and validation of the Fibromyalgia Detection (FibroDetect(R)) screening tool. *Health Qual Life Outcomes*, 12:128. doi:10.1186/s12955-014-0128-x
29. Bayram, B., Esatbeyoglu, T., Schulze, N., Ozcelik, B., Frank, J., Rimbach, G. (2012). Comprehensive analysis of polyphenols in 55 extra virgin olive oils by HPLC-ECD and their correlation with antioxidant activities. *Plant Foods Hum Nutr*, 67(4):326-336. doi:10.1007/s11130-012-0315-z
30. Bazzichi, L., Ciregia, F., Giusti, L., Baldini, C., Giannaccini, G., Giacomelli, C., et al. (2009). Detection of potential markers of primary fibromyalgia syndrome in human saliva. *Proteomics Clin Appl*, 3(11):1296-1304.
31. Bazzichi, L., Rossi, A., Giuliano, T., De Feo, F., Giacomelli, C., Consensi, A., et al. (2007a). Association between thyroid autoimmunity and fibromyalgic disease severity. *Clinical Rheumatology*, 26(12):2115-2120. doi:10.1007/s10067-007-0636-8
32. Bazzichi, L., Rossi, A., Massimetti, G., Giannaccini, G., Giuliano, T., De Feo, F., et al. (2007b). Cytokine patterns in fibromyalgia and their correlation with clinical manifestations. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 25(2):225-230.
33. Bereiter-Hahn, J., Voth, M., Mai, S., Jendrach, M. (2008). Structural implications of mitochondrial dynamics. *Biotechnol J*, 3(6):765-780. doi:10.1002/biot.200800024
34. Berg, D., Berg, L. H., Couvaras, J., Harrison, H. (1999). Chronic fatigue syndrome and/or fibromyalgia as a variation of antiphospholipid antibody syndrome: an explanatory model and approach to laboratory diagnosis. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 10(7):435-438.

35. Bertaggia, E., Scabia, G., Dalise, S., Lo Verso, F., Santini, F., Vitti, P., et al. (2014). Haptoglobin is required to prevent oxidative stress and muscle atrophy. *PLoS One*, 9(6):e100745. doi:10.1371/journal.pone.0100745
36. Bjorklund, G., Dadar, M., Chirumbolo, S., Aaseth, J. (2018). Fibromyalgia and nutrition: Therapeutic possibilities? *Biomed Pharmacother*, 103:531-538. doi:10.1016/j.biopha.2018.04.056
37. Blazer, A. D., Clancy, R. M. (2017). ApoL1 and the Immune Response of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Rheumatol Rep*, 19(3):13. doi:10.1007/s11926-017-0637-9
38. Boppart, M. D., Mahmassani, Z. S. (2019). Integrin Signaling: Linking Mechanical Stimulation to Skeletal Muscle Hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. doi:10.1152/ajpcell.00009.2019
39. Borges, G., Berrocoso, E., Mico, J. A., Neto, F. (2015). ERK1/2: Function, signaling and implication in pain and pain-related anxio-depressive disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 60:77-92. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.02.010
40. Bos, M. B., de Vries, J. H., Feskens, E. J., van Dijk, S. J., Hoelen, D. W., Siebelink, E., et al. (2010). Effect of a high monounsaturated fatty acids diet and a Mediterranean diet on serum lipids and insulin sensitivity in adults with mild abdominal obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 20(8):591-598.
41. Bote, M. E., Garcia, J. J., Hinchado, M. D., Ortega, E. (2012). Inflammatory/stress feedback dysregulation in women with fibromyalgia. *Neuroimmunomodulation*, 19(6):343-351. doi:10.1159/000341664
42. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
43. Bradley, L., Alberts, K., Alarcon, G., Alexander, M., Mountz, J., Weigent, D., et al. (Year). Abnormal brain regional cerebral blood flow (rCBF) and cerebrospinal fluid (CSF) levels of substance P (SP) in patients and non-patients with fibromyalgia (FM). en: *Arthritis and Rheumatism*, 1996. LIPPINCOTT-RAVEN PUBL 227 EAST WASHINGTON SQ, PHILADELPHIA, PA 19106, 1109-1109.
44. Brakebusch, C., Fassler, R. (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The EMBO journal*, 22(10):2324-2333. doi:10.1093/emboj/cdg245
45. Bramwell, B. L. (2010). The role of sex hormones on fibromyalgia pain mediators. *Int J Pharm Compd*, 14(3):193-199.
46. Britze, A., Birkler, R. I. D., Gregersen, N., Ovesen, T., Palmfeldt, J. (2014). Large-scale proteomics differentiates cholesteatoma from surrounding tissues and identifies novel proteins related to the pathogenesis. *PLoS One*, 9(8):e104103-e104103. doi:10.1371/journal.pone.0104103
47. Bugge, T. H., Pohl, J., Lonnoy, O., Stunnenberg, H. G. (1992). RXR alpha, a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. *The EMBO journal*, 11(4):1409-1418.
48. Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., Maiuolo, J., D'Agostino, M., Oliverio, M., et al. (2013). Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51(1):181-189. doi:10.1530/jme-12-0241
49. Bunnell, T. M., Burbach, B. J., Shimizu, Y., Ervasti, J. M. (2011). beta-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Molecular Biology of the Cell*, 22(21):4047-4058. doi:10.1091/mbc.E11-06-0582
50. Buskila, D., Cohen, H., Neumann, L., Epstein, R. P. (2004). An association between fibromyalgia and the dopamine D4 receptor exon III repeat polymorphism and relationship to novelty seeking personality traits. *Mol Psychiatry*, 9(8):730-731. doi:10.1038/sj.mp.4001506
51. Cabello-Moruno, R., Perona, J. S., Ruiz-Gutiérrez, V. (2007). Influence of minor components of olive oils on the composition and size of TRLs and on macrophage receptors involved in foam cell formation. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 3):470-471. doi:10.1042/bst0350470
52. Cabibbo, A., Pagani, M., Fabbri, M., Rocchi, M., Farmery, M. R., Bulleid, N. J., et al. (2000). ERO1-L, a human protein that favors disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7):4827-4833. doi:10.1074/jbc.275.7.4827
53. Calabriso, N., Gnoni, A., Stanca, E., Cavallo, A., Damiano, F., Siculella, L., et al. (2018). Hydroxytyrosol Ameliorates Endothelial Function under Inflammatory Conditions by Preventing Mitochondrial Dysfunction. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018:9086947-9086947. doi:10.1155/2018/9086947

54. Calderón-González, K. G.,Hernández-Monge, J.,Herrera-Aguirre, M. E.Luna-Arias, J. P. (2016). Bioinformatics Tools for Proteomics Data Interpretation. *Adv Exp Med Biol*, 919:281-341. doi:10.1007/978-3-319-41448-5_16
55. Camacho Vanegas, O.,Bertini, E.,Zhang, R. Z.,Petrini, S.,Minosse, C.,Sabatelli, P., et al. (2001). Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13):7516-7521. doi:10.1073/pnas.121027598
56. Camargo, A.,Ruano, J.,Fernandez, J. M.,Parnell, L. D.,Jimenez, A.,Santos-Gonzalez, M., et al. (2010). Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. *BMC Genomics*, 11:253. doi:10.1186/1471-2164-11-253
57. Cárdeno, A.,Sánchez-Hidalgo, M.,Aparicio-Soto, M.Alarcón de la Lastra, C. (2014). Unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil inhibits the inflammatory response in LPS-activated murine macrophages. *Food Chem*, 147:117-123. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.117
58. Carnevale, R.,Loffredo, L.,Del Ben, M.,Angelico, F.,Nocella, C.,Petruccioli, A., et al. (2017). Extra virgin olive oil improves post-prandial glycemic and lipid profile in patients with impaired fasting glucose. *Clinical Nutrition*, 36(3):782-787. doi:10.1016/j.clnu.2016.05.016
59. Carnevale, R.,Nocella, C.,Cammisotto, V.,Bartimoccia, S.,Monticolo, R.,D'Amico, A., et al. (2018). Antioxidant activity from extra virgin olive oil via inhibition of hydrogen peroxide-mediated NADPH-oxidase 2 activation. *Nutrition*, 55-56:36-40. doi:10.1016/j.nut.2018.03.045
60. Carrillo, C.,Cavia, M.Alonso-Torre, S. R. (2012). Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action: a review. *Nutr Hosp*, 27(6):1860-1865. doi:10.3305/nh.2012.27.6.6010
61. Casas, R.,Estruch, R.Sacanella, E. (2018). The Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil on Immune-mediated Inflammatory Responses. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 18(1):23-35. doi:10.2174/1871530317666171114115632
62. Ceciliani, F.,Giordano, A.Spagnolo, V. (2002). The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett*, 9(3):211-223.
63. Cengic, M.,Heljic, B.,Rasic, S.Dilic, M. (2002). Role of C-reactive protein in systemic lupus erythematosus. *Medicinski Arhiv*, 56(3):147-149.
64. Cicerale, S.,Lucas, L.Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci*, 11(2):458-479. doi:10.3390/ijms11020458
65. Cicerale, S.,Lucas, L. J.Keast, R. S. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotechnol*, 23(2):129-135. doi:10.1016/j.copbio.2011.09.006
66. Collado, A., i Mata, X. T., i Gassol, A. A., Gabaroi, D. C., Vilarrasa, R., Miyar, et al. (2001). Eficacia del tratamiento multidisciplinario del dolor crónico incapacitante del aparato locomotor. *Medicina Clínica*, 117(11), 401-405.
67. Collado, A., Torres, X., Messina, O. D., Vidal, L. F., Clark, P., Rios, C., et al. (2016). The Discriminatory Ability of the Fibromyalgia Rapid Screening Tool (FiRST): An International Study in Spain and Four Latin American Countries. *Pain Med*, 17(5), 931-939.
68. Cohen, H.,Buskila, D.,Neumann, L.Ebstein, R. P. (2002). Confirmation of an association between fibromyalgia and serotonin transporter promoter region (5- HTTLPR) polymorphism, and relationship to anxiety-related personality traits. *Arthritis Rheum*, 46(3):845-847.
69. Coppens, E.,Kempke, S.,Van Wambeke, P.,Claes, S.,Morlion, B.,Luyten, P., et al. (2018). Cortisol and Subjective Stress Responses to Acute Psychosocial Stress in Fibromyalgia Patients and Control Participants. *Psychosom Med*, 80(3):317-326. doi:10.1097/psy.0000000000000551
70. Cordero, M. D.,Alcocer-Gomez, E.,Cano-Garcia, F. J.,Sanchez-Dominguez, B.,Fernandez-Riejo, P.,Moreno Fernandez, A. M., et al. (2014a). Clinical symptoms in fibromyalgia are associated to overweight and lipid profile. *Rheumatology International*, 34(3):419-422. doi:10.1007/s00296-012-2647-2
71. Cordero, M. D.,Alcocer-Gómez, E.,Culic, O.,Carrión, A. M.,de Miguel, M.,Díaz-Parrado, E., et al. (2014b). NLRP3 inflammasome is activated in fibromyalgia: the effect of coenzyme Q10. *Antioxid Redox Signal*, 20(8):1169-1180. doi:10.1089/ars.2013.5198

72. Cordero, M. D., Alcocer-Gómez, E., de Miguel, M., Culic, O., Carrión, A. M., Álvarez-Suárez, J. M., et al. (2013a). Can coenzyme q10 improve clinical and molecular parameters in fibromyalgia? *Antioxid Redox Signal*, 19(12):1356-1361. doi:10.1089/ars.2013.5260
73. Cordero, M. D., Alcocer-Gomez, E., Marin-Aguilar, F., Rybkina, T., Cotan, D., Perez-Pulido, A., et al. (2016). Mutation in cytochrome b gene of mitochondrial DNA in a family with fibromyalgia is associated with NLRP3-inflammasome activation. *J Med Genet*, 53(2):113-122. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103392
74. Cordero, M. D., de Miguel, M., Carmona-Lopez, I., Bonal, P., Campa, F., Moreno-Fernandez, A. M. (2010a). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in fibromyalgia. *Neuro Endocrinol Lett*, 31(2):169-173.
75. Cordero, M. D., De Miguel, M., Moreno Fernandez, A. M., Carmona Lopez, I. M., Garrido Maraver, J., Cotan, D., et al. (2010b). Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease. *Arthritis Res Ther*, 12(1):R17. doi:10.1186/ar2918
76. Cordero, M. D., Díaz-Parrado, E., Carrión, A. M., Alfonsi, S., Sánchez-Alcázar, J. A., Bullón, P., et al. (2013b). Is inflammation a mitochondrial dysfunction-dependent event in fibromyalgia? *Antioxid Redox Signal*, 18(7):800-807. doi:10.1089/ars.2012.4892
77. Coskun Benlidayi, I. (2019). Role of inflammation in the pathogenesis and treatment of fibromyalgia. *Rheumatol Int*, 39(5):781-791. doi:10.1007/s00296-019-04251-6
78. Cristea, I. M., Gaskell, S. J., Whetton, A. D. (2004). Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood*, 103(10):3624-3634. doi:10.1182/blood-2003-09-3295
79. Crofford, L. J., Young, E. A., Engleberg, N. C., Korszun, A., Brucksch, C. B., McClure, L. A., et al. (2004). Basal circadian and pulsatile ACTH and cortisol secretion in patients with fibromyalgia and/or chronic fatigue syndrome. *Brain, Behavior, and Immunity*, 18(4):314-325. doi:10.1016/j.bbi.2003.12.011
80. Cuatrecasas, G., Alegre, C., Fernandez-Sola, J., Gonzalez, M. J., Garcia-Fructuoso, F., Poca-Dias, V., et al. (2012). Growth hormone treatment for sustained pain reduction and improvement in quality of life in severe fibromyalgia. *Pain*, 153(7):1382-1389. doi:10.1016/j.pain.2012.02.012
81. Cuatrecasas, G., González, M. J., Alegre, C., Sesiolo, G., Fernández-Sola, J., Casanueva, F. F., et al. (2010). High prevalence of growth hormone deficiency in severe fibromyalgia syndromes. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(9):4331-4337. doi:10.1210/jc.2010-0061
82. Cutillas, P. R., Timms, J. F. (2010). LC-MS/MS in proteomics: methods and applications. Springer.
83. Chandramouli, K., Qian, P. Y. (2009). Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics*, 2009. doi:10.4061/2009/239204
84. Charoenprasert, S., Mitchell, A. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J Agric Food Chem*, 60(29):7081-7095. doi:10.1021/jf3017699
85. Chiquet, M., Birk, D. E., Bonnemant, C., G. Koch, M. (2014). Collagen XII: Protecting bone and muscle integrity by organizing collagen fibrils. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 53:51-54. doi:10.1016/j.biocel.2014.04.020
86. Christiansen, J. J., Djurhuus, C. B., Gravholt, C. H., Iversen, P., Christiansen, J. S., Schmitz, O., et al. (2007). Effects of cortisol on carbohydrate, lipid, and protein metabolism: studies of acute cortisol withdrawal in adrenocortical failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(9):3553-3559. doi:10.1210/jc.2007-0445
87. D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., et al. (2001). Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab Dispos*, 29(11):1492-1498.
88. Davis, C., Bryan, J., Hodgson, J., Murphy, K. (2015). Definition of the Mediterranean Diet; a Literature Review. *Nutrients*, 7(11):9139-9153. doi:10.3390/nu7115459
89. de Beer, M. C., Yuan, T., Kindy, M. S., Asztalos, B. F., Roheim, P. S., de Beer, F. C. (1995). Characterization of constitutive human serum amyloid A protein (SAA4) as an apolipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 36(3):526-534.

90. de la Coba, P.,Bruehl, S.,Galvez-Sanchez, C. M.Reyes Del Paso, G. A. (2018). Slowly Repeated Evoked Pain as a Marker of Central Sensitization in Fibromyalgia: Diagnostic Accuracy and Reliability in Comparison With Temporal Summation of Pain. *Psychosom Med*, 80(6):573-580. doi:10.1097/psy.0000000000000599
91. de Lorgeril, M. (2011). PREDIMED trial: Mediterranean diet may reduce the risk of type 2 diabetes. *Evid Based Med*, 16(5):152-153. doi:10.1136/ebm1400
92. Demitrack, M. A.Crofford, L. J. (1998). Evidence for and pathophysiologic implications of hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 840:684-697.
93. Devaraj, S.,Torok, N.,Dasu, M. R.,Samols, D.Jialal, I. (2008). Adiponectin decreases C-reactive protein synthesis and secretion from endothelial cells: evidence for an adipose tissue-vascular loop. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(7):1368-1374. doi:10.1161/atvbaha.108.163303
94. Di Pierro, F.,Rossi, A.,Consensi, A.,Giacomelli, C.Bazzichi, L. (2017). Role for a water-soluble form of CoQ10 in female subjects affected by fibromyalgia. A preliminary study. *Clin Exp Rheumatol*, 35 Suppl 105(3):20-27.
95. Duchateau, P. N.,Pullinger, C. R.,Orellana, R. E.,Kunitake, S. T.,Naya-Vigne, J.,O'Connor, P. M., et al. (1997). Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41):25576-25582. doi:10.1074/jbc.272.41.25576
96. Dussailant, C.,Echeverria, G.,Urquiaga, I.,Velasco, N.Rigotti, A. (2016). [Current evidence on health benefits of the mediterranean diet]. *Rev Med Chil*, 144(8):1044-1052. doi:10.4067/s0034-98872016000800012
97. El Sayegh, T. Y.,Kapus, A.McCulloch, C. A. (2007). Beyond the epithelium: cadherin function in fibrous connective tissues. *FEBS Letters*, 581(2):167-174. doi:10.1016/j.febslet.2006.12.029
98. Erdem, M.,Celik, C.,Cayci, T.,Ozdemir, B.,Kurt, Y. G.,Akgul, E. O., et al. (2011). Serum haptoglobin levels in patients with melancholic and nonmelancholic major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(4):944-947. doi:10.1016/j.pnpbp.2011.01.009
99. Estévez-López, F.,Camiletti-Moiron, D.,Aparicio, V. A.,Segura-Jiménez, V.,Álvarez-Gallardo, I. C.,Soriano-Maldonado, A., et al. (2018). Identification of candidate genes associated with fibromyalgia susceptibility in southern Spanish women: the al-Andalus project. *J Transl Med*, 16(1):018-1416.
100. Fatima, G.,Das, S. K.,Mahdi, A. A.,Verma, N. S.,Khan, F. H.,Tiwari, A. M. K., et al. (2013). Circadian rhythm of serum cortisol in female patients with fibromyalgia syndrome. *Indian J Clin Biochem*, 28(2):181-184. doi:10.1007/s12291-012-0258-z
101. Favero, G.,Bonomini, F.,Franco, C.Rezzani, R. (2019). Mitochondrial Dysfunction in Skeletal Muscle of a Fibromyalgia Model: The Potential Benefits of Melatonin. *International journal of molecular sciences*, 20(3). doi:10.3390/ijms20030765
102. Feinberg, T.,Sambamoorthi, U.,Lilly, C.Innes, K. K. (2017). Potential Mediators between Fibromyalgia and C-Reactive protein: Results from a Large U.S. Community Survey. *BMC Musculoskeletal Disord*, 18(1):294. doi:10.1186/s12891-017-1641-y
103. Forman, H. J.Torres, M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine*, 22(4-5):189-216.
104. Freitas, R. P.,Lemos, T. M.,Spyrides, M. H.Sousa, M. B. (2012). Influence of cortisol and DHEA-S on pain and other symptoms in post menopausal women with fibromyalgia. *J Back Musculoskelet Rehabil*, 25(4):245-252. doi:10.3233/bmr-2012-0331
105. Furie, B.Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine*, 359(9):938-949. doi:10.1056/NEJMr0801082
106. Gabay, C.Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine*, 340(6):448-454. doi:10.1056/nejm199902113400607

- 107.** Gajko-Galicka, A. (2002). Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 49(2):433-441.
- 107.** Galvao, E. R., Martins, L. M., Ibiapina, J. O., Andrade, H. M., Monte, S. J. (2011). Breast cancer proteomics: a review for clinicians. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137(6):915-925. doi:10.1007/s00432-011-0978-0
- 108.** Gamberi, T., Magherini, F., Fiaschi, T. (2019). Adiponectin in Myopathies. *International journal of molecular sciences*, 20(7). doi:10.3390/ijms20071544
- 109.** García-Vilas, J. A., Quesada, A. R., Medina, M. Á. (2017). Hydroxytyrosol targets extracellular matrix remodeling by endothelial cells and inhibits both ex vivo and in vivo angiogenesis. *Food Chem*, 221:1741-1746. doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.111
- 110.** Gelse, K., Poschl, E., Aigner, T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(12):1531-1546.
- 111.** Giacomelli, C., Bazzichi, L., Giusti, L., Ciregia, F., Baldini, C., Da Valle, Y., et al. (2011). [MALDI-TOF and SELDI-TOF analysis: "tandem" techniques to identify potential biomarker in fibromyalgia]. *Reumatismo*, 63(3):165-170. doi:10.4081/reumatismo.2011.165
- 112.** Gilcrease, M. Z. (2007). Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Letters*, 247(1):1-25. doi:10.1016/j.canlet.2006.03.031
- 113.** Giordano, E., Davalos, A., Nicod, N., Visioli, F. (2014). Hydroxytyrosol attenuates tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in human hepatocarcinoma cells. *Mol Nutr Food Res*, 58(5):954-962. doi:10.1002/mnfr.201300465
- 114.** Goebel, A., Buhner, S., Schedel, R., Lochs, H., Sprotte, G. (2008). Altered intestinal permeability in patients with primary fibromyalgia and in patients with complex regional pain syndrome. *Rheumatology*, 47(8):1223-1227. doi:10.1093/rheumatology/ken140
- 115.** Grayston, R., Czanner, G., Elhadd, K., Goebel, A., Frank, B., Uceyler, N., et al. (2019). A systematic review and meta-analysis of the prevalence of small fiber pathology in fibromyalgia: Implications for a new paradigm in fibromyalgia etiopathogenesis. *Semin Arthritis Rheum*, 48(5):933-940. doi:10.1016/j.semarthrit.2018.08.003
- 116.** Groschwitz, K. R., Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1):3-20; quiz 21-22. doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038
- 117.** Gur, A., Cevik, R., Sarac, A. J., Colpan, L., Em, S. (2004). Hypothalamic-pituitary-gonadal axis and cortisol in young women with primary fibromyalgia: the potential roles of depression, fatigue, and sleep disturbance in the occurrence of hypocortisolism. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63(11):1504-1506. doi:10.1136/ard.2003.014969
- 118.** Guyton, A. C., Hall, J. E., Moreno, M. J. (1971). Tratado de fisiología médica, Edición 9ª. Madrid: Interamericana México.
- 119.** Hadker, N., Garg, S., Chandran, A. B., Crean, S. M., McNett, M. M., Silverman, S. L. (2011). Efficient practices associated with diagnosis, treatment and management of fibromyalgia among primary care physicians. *Pain Res Manag*, 16(6):440-444.
- 120.** Häggström, M. (2014). Medical gallery of Mikael Häggström 2014. *WikiJournal of Medicine*, 1(2). doi:10.15347/wjm/2014.008
- 121.** Haliloglu, S., Carlioglu, A., Akdeniz, D., Karaaslan, Y., Kosar, A. (2014). Fibromyalgia in patients with other rheumatic diseases: prevalence and relationship with disease activity. *Rheumatol Int*, 34(9):1275-1280.
- 122.** Hao, J., Shen, W., Yu, G., Jia, H., Li, X., Feng, Z., et al. (2010). Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem*, 21(7):634-644. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.03.012
- 123.** Harbeck, B., Sufke, S., Harten, P., Haas, C. S., Lehnert, H., Monig, H. (2013). High prevalence of fibromyalgia-associated symptoms in patients with hypothalamic-pituitary disorders. *Clin Exp Rheumatol*, 31(6 Suppl 79):S16-21.
- 124.** Häuser, W., Fitzcharles, M. A. (2018). Facts and myths pertaining to fibromyalgia. *Dialogues Clin Neurosci*, 20(1):53-62.

125. Häuser, W., Perrot, S., Sommer, C., Shir, Y., Fitzcharles, M. A. (2017). Diagnostic confounders of chronic widespread pain: not always fibromyalgia. *Pain Rep*, 2(3):e598. doi:10.1097/pr9.0000000000000598
126. Hausteiner-Wiehle, C., Henningsen, P. (2014). Irritable bowel syndrome: relations with functional, mental, and somatoform disorders. *World J Gastroenterol*, 20(20):6024-6030.
127. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal*, 334 (Pt 2)(Pt 2):297-314. doi:10.1042/bj3340297
128. Heinrich, P. C., Castell, J. V., Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *The Biochemical journal*, 265(3):621-636. doi:10.1042/bj2650621
129. Hermanns-Lê, T., Piérard, G. E., Angenot, P. (2013). [Fibromyalgia: an unrecognized Ehlers-Danlos syndrome hypermobile type?]. *Revue Medicale de Liege*, 68(1):22-24.
130. Hicks, D., Farsani, G. T., Laval, S., Collins, J., Sarkozy, A., Martoni, E., et al. (2014). Mutations in the collagen XII gene define a new form of extracellular matrix-related myopathy. *Human Molecular Genetics*, 23(9):2353-2363. doi:10.1093/hmg/ddt637
131. Hirsh, S., Ben-Dor, A. (2016). Finding a Needle in a Haystack: the Advantages of Liquid Chromatography--Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) in Determination of Sex Hormones in Children. *Pediatr Endocrinol Rev*, 13(4):714-719.
132. Hoshino, S., Sakamoto, K., Vassilopoulos, S., Camus, S. M., Griffin, C. A., Esk, C., et al. (2013). The CHC22 clathrin-GLUT4 transport pathway contributes to skeletal muscle regeneration. *PLoS One*, 8(10):e77787. doi:10.1371/journal.pone.0077787
133. Hossain, M. M., Crish, J. F., Eckert, R. L., Lin, J. J. C., Jin, J.-P. (2005). h2-Calponin is regulated by mechanical tension and modifies the function of actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*, 280(51):42442-42453. doi:10.1074/jbc.M509952200
134. Izai, K., Uchida, Y., Orii, T., Yamamoto, S., Hashimoto, T. (1992). Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(2):1027-1033.
135. Izu, Y., Sun, M., Zwolanek, D., Veit, G., Williams, V., Cha, B., et al. (2011). Type XII collagen regulates osteoblast polarity and communication during bone formation. *The Journal of cell biology*, 193(6):1115-1130. doi:10.1083/jcb.201010010
136. Jahan, F., Nanji, K., Qidwai, W., Qasim, R. (2012). Fibromyalgia Syndrome: An Overview of Pathophysiology, Diagnosis and Management.
137. Jeschonnek, M., Grohmann, G., Hein, G., Sprott, H. (2000). Abnormal microcirculation and temperature in skin above tender points in patients with fibromyalgia. *Rheumatology*, 39(8):917-921.
138. Jones, G. T., Atzeni, F., Beasley, M., Fluss, E., Sarzi-Puttini, P., Macfarlane, G. J. (2015). The prevalence of fibromyalgia in the general population: a comparison of the American College of Rheumatology 1990, 2010, and modified 2010 classification criteria. *Arthritis Rheumatol*, 67(2):568-575. doi:10.1002/art.38905
139. Jong, M. C., Hofker, M. H., Havekes, L. M. (1999). Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(3):472-484.
140. Juliano, R. L., Reddig, P., Alahari, S., Edin, M., Howe, A., Aplin, A. (2004). Integrin regulation of cell signalling and motility. *Biochemical Society Transactions*, 32(Pt3):443-446. doi:10.1042/bst0320443
141. Julien, N., Goffaux, P., Arsenault, P., Marchand, S. (2005). Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain*, 114(1-2):295-302. doi:10.1016/j.pain.2004.12.032
142. Jumeau, C., Awad, F., Assrawi, E., Cobret, L., Duquesnoy, P., Giurgea, I., et al. (2019). Expression of SAA1, SAA2 and SAA4 genes in human primary monocytes and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 14(5):e0217005. doi:10.1371/journal.pone.0217005
143. Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7):671-701.

- 144.** Kamarudin, A. N., Cox, T., Kolamunnage-Dona, R. (2017). Time-dependent ROC curve analysis in medical research: current methods and applications. *BMC Med Res Methodol*, 17(1):53. doi:10.1186/s12874-017-0332-6
- 145.** Kamijo, T., Aoyama, T., Miyazaki, J., Hashimoto, T. (1993). Molecular cloning of the cDNAs for the subunits of rat mitochondrial fatty acid beta-oxidation multienzyme complex. Structural and functional relationships to other mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 268(35):26452-26460.
- 146.** Kanehisa, M., Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28(1):27-30.
- 147.** Karlsson, B., Burell, G., Anderberg, U. M., Svardsudd, K. (2015). Cognitive behaviour therapy in women with fibromyalgia: A randomized clinical trial. *Scand J Pain*, 9(1):11-21. doi:10.1016/j.sjpain.2015.04.027
- 148.** Katsarou, A. I., Kaliora, A. C., Papalois, A., Chiou, A., Kalogeropoulos, N., Agrogiannis, G., et al. (2015). Serum lipid profile and inflammatory markers in the aorta of cholesterol-fed rats supplemented with extra virgin olive oil, sunflower oils and oil-products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(7):766-773. doi:10.3109/09637486.2015.1088936
- 149.** Khoonsari, P. E., Musunri, S., Herman, S., Svensson, C. I., Tanum, L., Gordh, T., et al. (2019). Systematic analysis of the cerebrospinal fluid proteome of fibromyalgia patients. *J Proteomics*, 190:35-43. doi:10.1016/j.jprot.2018.04.014
- 150.** Kim, K., McCully, M. E., Bhattacharya, N., Butler, B., Sept, D., Cooper, J. A. (2007). Structure/function analysis of the interaction of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with actin-capping protein: implications for how capping protein binds the actin filament. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8):5871-5879. doi:10.1074/jbc.M609850200
- 151.** Klein, C. J., Lennon, V. A., Aston, P. A., McKeon, A., Pittock, S. J. (2012). Chronic pain as a manifestation of potassium channel-complex autoimmunity. *Neurology*, 79(11):1136-1144. doi:10.1212/WNL.0b013e3182698cab
- 152.** Koca, T. T., Berk, E., Seyithanoglu, M., Kocyigit, B. F., Demirel, A. (2018). Relationship of leptin, growth hormone, and insulin-like growth factor levels with body mass index and disease severity in patients with fibromyalgia syndrome. *Acta Neurol Belg*. doi:10.1007/s13760-018-01063-6
- 153.** Korpos, E., Wu, C., Sorokin, L. (2009). Multiple roles of the extracellular matrix in inflammation. *Current Pharmaceutical Design*, 15(12):1349-1357. doi:10.2174/138161209787846685
- 154.** Krsnich-Shriwise, S. (1997). Fibromyalgia syndrome: an overview. *Phys Ther*, 77(1):68-75.
- 155.** Kuhlman, P. A., Hughes, C. A., Bennett, V., Fowler, V. M. (1996). A new function for adducin. Calcium/calmodulin-regulated capping of the barbed ends of actin filaments. *Journal of Biological Chemistry*, 271(14):7986-7991. doi:10.1074/jbc.271.14.7986
- 156.** Kuroshima, A., Habara, Y., Uehara, A., Murazumi, K., Yahata, T., Ohno, T. (1984). Cross adaptation between stress and cold in rats. *Pflugers Archiv. European Journal of Physiology*, 402(4):402-408. doi:10.1007/bf00583941
- 157.** Kuzmicic, J., Del Campo, A., López-Crisosto, C., Morales, P. E., Pennanen, C., Bravo-Sagua, R., et al. (2011). Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure. *Revista Espanola de Cardiologia*, 64(10):916-923. doi:10.1016/j.recesp.2011.05.018
- 158.** La Rubia, M., Rus, A., Molina, F., Del Moral, M. L. (2013). Is fibromyalgia-related oxidative stress implicated in the decline of physical and mental health status? *Clin Exp Rheumatol*, 31(6 Suppl 79):16.
- 159.** Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-685.
- 160.** Lamandé, S. R., Bateman, J. F. (2018). Collagen VI disorders: Insights on form and function in the extracellular matrix and beyond. *Matrix Biology*, 71-72:348-367. doi:10.1016/j.matbio.2017.12.008
- 161.** Lami, M. J., Martínez, M. P., Sánchez, A. I. (2013). Systematic review of psychological treatment in fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep*, 17(7):345. doi:10.1007/s11916-013-0345-8

162. Larson, A. A.,Pardo, J. V.Pasley, J. D. (2014). Review of overlap between thermoregulation and pain modulation in fibromyalgia. *Clinical Journal of Pain*, 30(6):544-555. doi:10.1097/AJP.0b013e3182a0e383

163. Larsson, A.,Palstam, A.,Lofgren, M.,Ernberg, M.,Bjersing, J.,Bileviciute-Ljungar, I., et al. (2015). Resistance exercise improves muscle strength, health status and pain intensity in fibromyalgia-a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther*, 17:161. doi:10.1186/s13075-015-0679-1

164. Lawson, K. (2016). Potential drug therapies for the treatment of fibromyalgia. *Expert Opin Investig Drugs*, 25(9):1071-1081. doi:10.1080/13543784.2016.1197906

165. Lee, J. O.,Bankston, L. A.,Arnaout, M. A.Liddington, R. C. (1995). Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure*, 3(12):1333-1340.

166. Lentjes, E. G.,Griep, E. N.,Boersma, J. W.,Romijn, F. P.de Kloet, E. R. (1997). Glucocorticoid receptors, fibromyalgia and low back pain. *Psychoneuroendocrinology*, 22(8):603-614.

167. Lerma-García, M. J.,Herrero-Martínez, J. M.,Ramis-Ramos, G.Simó-Alfonso, E. F. (2008). Prediction of the genetic variety of Spanish extra virgin olive oils using fatty acid and phenolic compound profiles established by direct infusion mass spectrometry. *Food Chem*, 108(3):1142-1148. doi:10.1016/j.foodchem.2007.11.065

168. Lesch, K. P.,Bengel, D.,Heils, A.,Sabol, S. Z.,Greenberg, B. D.,Petri, S., et al. (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*, 274(5292):1527-1531.

169. Levin, Y.,Schwarz, E.,Wang, L.,Leweke, F. M.Bahn, S. (2007). Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics for large-scale biomarker discovery in complex samples. *J Sep Sci*, 30(14):2198-2203. doi:10.1002/jssc.200700189

170. Lewis, G. F.Rader, D. J. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation Research*, 96(12):1221-1232. doi:10.1161/01.RES.0000170946.56981.5c

171. Lewis, J. G.,Bagley, C. J.,Elder, P. A.,Bachmann, A. W.Torpy, D. J. (2005). Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clinica Chimica Acta*, 359(1-2):189-194. doi:10.1016/j.cccn.2005.03.044

172. Li, J.,Yang, G.,Wang, S.,Jiang, L.,Liu, X.,Geng, C., et al. (2012). The protective effects of hydroxytyrosol against ortho-phenylphenol-induced DNA damage in HepG2 cells. *Toxicol Mech Methods*, 22(6):432-437. doi:10.3109/15376516.2012.666659

173. Li, W. W.,Nemirovskiy, O.,Fountain, S.,Rodney Mathews, W.Szekely-Klepser, G. (2007). Clinical validation of an immunoaffinity LC-MS/MS assay for the quantification of a collagen type II neoepitope peptide: A biomarker of matrix metalloproteinase activity and osteoarthritis in human urine. *Anal Biochem*, 369(1):41-53. doi:10.1016/j.ab.2007.05.002

174. Li, Y.,Wang, X.,Wang, F.,You, L.,Xu, P.,Cao, Y., et al. (2019). Identification of intracellular peptides associated with thermogenesis in human brown adipocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5):7104-7114. doi:10.1002/jcp.27465

175. Lind, S. E.Smith, C. J. (1991). Actin is a noncompetitive plasmin inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 266(8):5273-5278.

176. Littlejohn, G.Guymer, E. (2018). Neurogenic inflammation in fibromyalgia. *Semin Immunopathol*, 40(3):291-300. doi:10.1007/s00281-018-0672-2

177. Liu, Z.,Welin, M.,Bragee, B.,Thörnwall, M.Nyberg, F. (1995). Elevated substance P level in cerebrospinal fluid from patients with fibromyalgia is contrasted by a decrease in Met-enkephalin-Arg-Phe. *Analgesia*, 1(4-5):543-547.

178. López, S.,Bermúdez, B.,Montserrat-de la Paz, S.,Jaramillo, S.,Varela, L. M.,Ortega-Gómez, A., et al. (2014). Membrane composition and dynamics: a target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(6):1638-1656. doi:10.1016/j.bbamem.2014.01.007

179. Loued, S.,Berrougui, H.,Componova, P.,Ikhlef, S.,Helal, O.Khalil, A. (2013). Extra-virgin olive oil consumption reduces the age-related decrease in HDL and paraoxonase 1 anti-inflammatory activities. *Br J Nutr*, 110(7):1272-1284.

- 180.** Lukkahatai, N.,Walitt, B.,Deandres-Galiana, E. J.,Fernandez-Martinez, J. L.Saligan, L. N. (2018). A predictive algorithm to identify genes that discriminate individuals with fibromyalgia syndrome diagnosis from healthy controls. *J Pain Res*, 11:2981-2990. doi:10.2147/jpr.s169499
- 181.** Luque-Sierra, A.,Álvarez-Amor, L.,Kleemann, R.,Martín, F.Varela, L. M. (2018). Extra-Virgin Olive Oil with Natural Phenolic Content Exerts an Anti-Inflammatory Effect in Adipose Tissue and Attenuates the Severity of Atherosclerotic Lesions in Ldlr-/-Leiden Mice. *Mol Nutr Food Res*, 62(13):e1800295. doi:10.1002/mnfr.201800295
- 182.** Macfarlane, G. J.,Kronisch, C.,Dean, L. E.,Atzeni, F.,Haüser, W.,Fluss, E., et al. (2017). EULAR revised recommendations for the management of fibromyalgia. *Ann Rheum Dis*, 76(2):318-328. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209724
- 183.** Madhavan, S. M.O'Toole, J. F. (2014). The biology of APOL1 with insights into the association between APOL1 variants and chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*, 18(2):238-242. doi:10.1007/s10157-013-0907-4
- 184.** Maes, M.,Scharpe, S.,Meltzer, H. Y.Cosyns, P. (1993). Relationships between increased haptoglobin plasma levels and activation of cell-mediated immunity in depression. *Biological Psychiatry*, 34(10):690-701.
- 185.** Mak, P. A.,Laffitte, B. A.,Desrumaux, C.,Joseph, S. B.,Curtiss, L. K.,Mangelsdorf, D. J., et al. (2002). Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35):31900-31908. doi:10.1074/jbc.M202993200
- 186.** Marques, A. P.,Santo, A. d. S. d. E.,Berssaneti, A. A.,Matsutani, L. A.Yuan, S. L. K. (2017). Prevalence of fibromyalgia: literature review update. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*, 57(4):356-363. doi:10.1016/j.rbre.2017.01.005
- 187.** Martínez-González, M. A.,Salas-Salvado, J.,Estruch, R.,Corella, D.,Fitó, M.Ros, E. (2015). Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis*, 58(1):50-60. doi:10.1016/j.pcad.2015.04.003
- 188.** Martínez-Jauand, M.,Sitges, C.,Rodríguez, V.,Picornell, A.,Ramón, M.,Buskila, D., et al. (2013). Pain sensitivity in fibromyalgia is associated with catechol-O-methyltransferase (COMT) gene. *Eur J Pain*, 17(1):16-27. doi:10.1002/j.1532-2149.2012.00153.x
- 189.** Marum, A. P.,Moreira, C.,Saraiva, F.,Tomas-Carus, P.Sousa-Guerreiro, C. (2016). A low fermentable oligo-di-mono saccharides and polyols (FODMAP) diet reduced pain and improved daily life in fibromyalgia patients. *Scand J Pain*, 13:166-172. doi:10.1016/j.sjpain.2016.07.004
- 190.** Marzo, A.Bo, L. D. (2007). Tandem mass spectrometry (LC-MS-MS): a predominant role in bioassays for pharmacokinetic studies. *Arzneimittelforschung*, 57(2):122-128. doi:10.1055/s-0031-1296593
- 191.** Mas, A. J.,Carmona, L.,Valverde, M.Ribas, B. (2008). Prevalence and impact of fibromyalgia on function and quality of life in individuals from the general population: results from a nationwide study in Spain. *Clin Exp Rheumatol*, 26(4):519-526.
- 192.** Matáix-Verdú, F. J., Martínez de Victoria-Muñoz, E. (1988). Composición del Aceite de Oliva. en: JAÉN, D. P. D. (ed.) El aceite de Oliva (bases para el futuro). Edición ed. Jaén: Patronado de Promoción Provincial.
- 193.** Mazzini, I. (2000). [Use of olive oil in medicine in the ancient world]. *Medizinhist J*, 35(2):105-126.
- 194.** McCrae, C. S.,Mundt, J. M.,Curtis, A. F.,Craggs, J. G.,O'Shea, A. M.,Staud, R., et al. (2018). Gray Matter Changes Following Cognitive Behavioral Therapy for Patients With Comorbid Fibromyalgia and Insomnia: A Pilot Study. *J Clin Sleep Med*, 14(9):1595-1603. doi:10.5664/jcsm.7344
- 195.** Medeiros-de-Moraes, I. M.,Goncalves-de-Albuquerque, C. F.,Kurz, A. R. M.,Oliveira, F. M. J.,de Abreu, V. H. P.,Torres, R. C., et al. (2018). Omega-9 Oleic Acid, the Main Compound of Olive Oil, Mitigates Inflammation during Experimental Sepsis. *Oxid Med Cell Longev*, 2018:6053492. doi:10.1155/2018/6053492
- 196.** Medina-Remón, A.,Tresserra-Rimbau, A.,Pons, A.,Tur, J. A.,Martorell, M.,Ros, E., et al. (2015). Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high

cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 25(1):60-67. doi:10.1016/j.numecd.2014.09.001

197. Meeus, M., Nijs, J., Hermans, L., Goubert, D., Calders, P. (2013). The role of mitochondrial dysfunctions due to oxidative and nitrosative stress in the chronic pain or chronic fatigue syndromes and fibromyalgia patients: peripheral and central mechanisms as therapeutic targets? *Expert Opin Ther Targets*, 17(9):1081-1089. doi:10.1517/14728222.2013.818657

198. Mehraban, F., Finegan, C. K., Moskowitz, R. W. (1991). Serum keratan sulfate. Quantitative and qualitative comparisons in inflammatory versus noninflammatory arthritides. *Arthritis and Rheumatism*, 34(4):383-392. doi:10.1002/art.1780340403

199. Mekircha, F., Chebab, S., Gabbianelli, R., Leghouchi, E. (2018). The possible ameliorative effect of *Olea europaea* L. oil against deltamethrin-induced oxidative stress and alterations of serum concentrations of thyroid and reproductive hormones in adult female rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161:374-382. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.05.086

200. Mertoglu, C., Gunay, M., Yerligok, O. (2018). Could Endocan, a Marker of Inflammation and Endothelial Dysfunction, be a New Diagnostic Marker for Fibromyalgia? *Clinica y Laboratorio*, 64(3):405-410. doi:10.7754/Clin.Lab.2017.171024

201. Mettlen, M., Chen, P. H., Srinivasan, S., Danuser, G., Schmid, S. L. (2018). Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 87:871-896. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-012644

202. Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D., et al. (2017). PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Research*, 45(D1):D183-D189. doi:10.1093/nar/gkw1138

203. Milovanovic, M., Nilsson, S., Harakka, P., Post, C., Gerlde, B. (2016). High in vivo platelet activity in female fibromyalgia patients. *Journal of Biomedical Sciences*, 5(3: 21):1-5.

204. Miller, A. H., Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol*, 16(1):22-34. doi:10.1038/nri.2015.5

205. Molina, F., Del Moral, M. L., La Rubia, M., Blanco, S., Carmona, R., Rus, A. (2019). Are Patients With Fibromyalgia in a Prothrombotic State? *Biol Res Nurs*, 21(2):224-230. doi:10.1177/1099800418824716

206. Montuschi, P. (2009). LC/MS/MS analysis of leukotriene B4 and other eicosanoids in exhaled breath condensate for assessing lung inflammation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877(13):1272-1280. doi:10.1016/j.jchromb.2009.01.036

207. Mosele, J. I., Martin-Pelaez, S., Macia, A., Farras, M., Valls, R. M., Catalan, U., et al. (2014). Faecal microbial metabolism of olive oil phenolic compounds: in vitro and in vivo approaches. *Mol Nutr Food Res*, 58(9):1809-1819. doi:10.1002/mnfr.201400124

208. Mosher, D. F. (1984). Physiology of fibronectin. *Annual Review of Medicine*, 35:561-575. doi:10.1146/annurev.me.35.020184.003021

209. Mosher, D. F., Schad, P. E. (1979). Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa. *Journal of Clinical Investigation*, 64(3):781-787. doi:10.1172/jci109524

210. Mueller, L. N., Brusniak, M. Y., Mani, D. R., Aebersold, R. (2008). An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data. *J Proteome Res*, 7(1):51-61. doi:10.1021/pr700758r

211. Muller, H. J. (1953). The Call of Biology. *AIBS Bulletin*, 3(5):4-4. doi:10.1093/aibsbulletin/3.5.4

212. Musumeci, G., Aiello, F. C., Szychlińska, M. A., Di Rosa, M., Castrogiovanni, P., Mobasher, A. (2015). Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *International journal of molecular sciences*, 16(3):6093-6112. doi:10.3390/ijms16036093

213. Neeck, G., Riedel, W. (1992). Thyroid function in patients with fibromyalgia syndrome. *Journal of Rheumatology*, 19(7):1120-1122.

214. Nehls, V. (2018). Osteoarthropathies and Myopathies associated with Disorders of the Thyroid Endocrine System. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 143(16):1174-1180. doi:10.1055/s-0043-121381

- 215.** Nelson, D. L., Cox, M. M. (2015). *Lehninger: principios de bioquímica*, Edición 4ª.
- 216.** Nieswandt, B., Watson, S. P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, 102(2):449-461. doi:10.1182/blood-2002-12-3882
- 217.** Nijm, J., Jonasson, L. (2009). Inflammation and cortisol response in coronary artery disease. *Ann Med*, 41(3):224-233. doi:10.1080/07853890802508934
- 218.** Nobili, V., Alisi, A., Mosca, A., Crudele, A., Zaffina, S., Denaro, M., et al. (2019). The Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Vitamin E on Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease, in a Clinical Trial: A New Treatment? *Antioxid Redox Signal*, 31(2):127-133. doi:10.1089/ars.2018.7704
- 219.** Nugent, A. E., Speicher, D. M., Gradisar, I., McBurney, D. L., Baraga, A., Doane, K. J., et al. (2009). Advanced osteoarthritis in humans is associated with altered collagen VI expression and upregulation of ER-stress markers Grp78 and bag-1. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(10):923-931. doi:10.1369/jhc.2009.953893
- 220.** Nystrom, F., Aardal, E., Ohman, K. P. (1998). A population-based study of the white-coat blood pressure effect: positive correlation with plasma cortisol. *Clin Exp Hypertens*, 20(1):95-104.
- 221.** O'Dowd, Y., Driss, F., Dang, P. M., Elbim, C., Gougerot-Pocidalo, M. A., Pasquier, C., et al. (2004). Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem Pharmacol*, 68(10):2003-2008. doi:10.1016/j.bcp.2004.06.023
- 222.** Offenbaecher, M., Bondy, B., de Jonge, S., Glatzeder, K., Kruger, M., Schoeps, P., et al. (1999). Possible association of fibromyalgia with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Arthritis Rheum*, 42(11):2482-2488. doi:10.1002/1529-0131(199911)42:11<2482::aid-anr27>3.0.co;2-b
- 223.** Oikonomopoulou, K., Ricklin, D., Ward, P. A., Lambris, J. D. (2012). Interactions between coagulation and complement--their role in inflammation. *Semin Immunopathol*, 34(1):151-165. doi:10.1007/s00281-011-0280-x
- 224.** Okogeri, O., Tasioula-Margari, M. (2002). Changes occurring in phenolic compounds and alpha-tocopherol of virgin olive oil during storage. *J Agric Food Chem*, 50(5):1077-1080.
- 225.** Okroj, M., Heinegard, D., Holmdahl, R., Blom, A. M. (2007). Rheumatoid arthritis and the complement system. *Annals of Medicine*, 39(7):517-530. doi:10.1080/07853890701477546
- 226.** Oliveras-López, M. J., Molina, J. J., Mir, M. V., Rey, E. F., Martín, F., de la Serrana, H. L. (2013). Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans. *Arch Gerontol Geriatr*, 57(2):234-242. doi:10.1016/j.archger.2013.04.002
- 227.** Ono, S. (2007). Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *International Review of Cytology*, 258:1-82. doi:10.1016/s0074-7696(07)58001-0
- 228.** Ortea, I., O'Connor, G., Maquet, A. (2016). Review on proteomics for food authentication. *J Proteomics*, 147:212-225. doi:10.1016/j.jprot.2016.06.033
- 229.** Ottman, A. A., Warner, C. B., Brown, J. N. (2018). The role of mirtazapine in patients with fibromyalgia: a systematic review. *Rheumatol Int*, 38(12):2217-2224. doi:10.1007/s00296-018-4068-3
- 230.** Overall, C. M. (2001). Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods in Molecular Biology*, 151:79-120.
- 231.** Parapia, L. A., Jackson, C. (2008). Ehlers-Danlos syndrome--a historical review. *British Journal of Haematology*, 141(1):32-35. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.06994.x
- 232.** Park, D.-J., Kang, J.-H., Yim, Y.-R., Kim, J.-E., Lee, J.-W., Lee, K.-E., et al. (2015). Exploring Genetic Susceptibility to Fibromyalgia. *Chonnam Med J*, 51(2):58-65. doi:10.4068/cmj.2015.51.2.58
- 233.** Pastor, A., Rodriguez-Morato, J., Olesti, E., Pujadas, M., Perez-Mana, C., Khymenets, O., et al. (2016). Analysis of free hydroxytyrosol in human plasma following the administration of olive oil. *J Chromatogr A*, 1437:183-190. doi:10.1016/j.chroma.2016.02.016
- 234.** Perdomo, L., Beneit, N., Otero, Y. F., Escribano, O., Diaz-Castroverde, S., Gomez-Hernandez, A., et al. (2015). Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. *Cardiovasc Diabetol*, 14:75. doi:10.1186/s12933-015-0237-9

- 235.** Perrot, S., Bouhassira, D., Fermanian, J. (2010). Development and validation of the Fibromyalgia Rapid Screening Tool (FiRST). *Pain*, 150(2), 250-256.
- 236.** Pirozzi, C., Lama, A., Simeoli, R., Paciello, O., Pagano, T. B., Mollica, M. P., et al. (2016). Hydroxytyrosol prevents metabolic impairment reducing hepatic inflammation and restoring duodenal integrity in a rat model of NAFLD. *J Nutr Biochem*, 30:108-115. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.12.004
- 237.** Popov, I., Nenov, A., Petrov, P., Vassilev, D. (2009). Bioinformatics in Proteomics: A Review on Methods and Algorithms. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(1):1115-1120. doi:10.1080/13102818.2009.10817624
- 238.** Prados, G., Miró, E. (2012). [Fibromyalgia and sleep: a review]. *Rev Neurol*, 54(4):227-240.
- 239.** Pronacera Therapeutics S.L. (2019). FibroKit: una nueva herramienta que ayuda al médico en el diagnóstico de la fibromialgia y/o en el seguimiento del paciente [Online]. Sevilla: Pronacera Therapeutic S.L. Disponible en: <https://www.pronacera.com/es/fibrokit/> [Recuperado el 27 de diciembre 2019].
- 240.** Puigserver, P., Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*, 24(1):78-90. doi:10.1210/er.2002-0012
- 241.** Qiu, F., Chen, F., Liu, D., Xu, J., He, J., Xiao, J., et al. (2019). [LC-MS/MS-based screening of new protein biomarkers for cervical precancerous lesions and cervical cancer]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 39(1):13-22. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2019.01.03
- 242.** R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- 243.** Raederstorff, D. (2009). Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *Int J Vitam Nutr Res*, 79(3):152-165. doi:10.1024/0300-9831.79.3.152
- 244.** Ramakrishnan, N., Jialal, I. (2019). Biochemistry, Adiponectin. *StatPearls*. 2019/02/07 ed. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- 245.** Ramírez-Tortosa, M. C., Urbano, G., López-Jurado, M., Nestares, T., Gómez, M. C., Mir, A., et al. (1999). Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *The Journal of nutrition*, 129(12):2177-2183. doi:10.1093/jn/129.12.2177
- 246.** Ramírez, E., Brenes, M., García, P., Medina, E., Romero, C. (2016). Oleuropein hydrolysis in natural green olives: Importance of the endogenous enzymes. *Food Chem*, 206:204-209. doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.061
- 247.** Razquin, C., Toledo, E., Clish, C. B., Ruiz-Canela, M., Dennis, C., Corella, D., et al. (2018). Plasma Lipidomic Profiling and Risk of Type 2 Diabetes in the PREDIMED Trial. *Diabetes Care*, 41(12):2617-2624. doi:10.2337/dc18-0840
- 248.** Refetoff, S., Larsen, R. (1989). Transport, cellular uptake, and metabolism of thyroid hormone. en: DEGROOT, L. (ed.) *Endocrinology*, 2ª ed. Edición ed. Philadelphia: Saunders Elsevier
- 249.** Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11(9):785-797. doi:10.1038/ni.1923
- 250.** Richard, N., Arnold, S., Hoeller, U., Kilpert, C., Wertz, K., Schwager, J. (2011). Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta Med*, 77(17):1890-1897. doi:10.1055/s-0031-1280022
- 251.** Rigacci, S., Stefani, M. (2016). Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *Int J Mol Sci*, 17(6). doi:10.3390/ijms17060843
- 252.** Robles-Almazán, M., Pulido-Morán, M., Moreno-Fernández, J., Ramírez-Tortosa, C., Rodríguez-García, C., Quiles, J. L., et al. (2018). Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res Int*, 105:654-667. doi:10.1016/j.foodres.2017.11.053
- 253.** Ros, E., Martínez-González, M. A., Estruch, R., Salas-Salvado, J., Fito, M., Martínez, J. A., et al. (2014). Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Adv Nutr*, 5(3):330S-336S. doi:10.3945/an.113.005389

- 254.** Rosillo, M. A., Alcaraz, M. J., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández-Bolanos, J. G., Alarcón-de-la-Lastra, C., Ferrándiz, M. L. (2014). Anti-inflammatory and joint protective effects of extra-virgin olive-oil polyphenol extract in experimental arthritis. *J Nutr Biochem*, 25(12):1275-1281. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.07.006
- 255.** Rossi, M., Caruso, F., Kwok, L., Lee, G., Caruso, A., Gionfra, F., et al. (2017). Protection by extra virgin olive oil against oxidative stress in vitro and in vivo. Chemical and biological studies on the health benefits due to a major component of the Mediterranean diet. *PLoS One*, 12(12):e0189341. doi:10.1371/journal.pone.0189341
- 256.** Rozpędek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczńska, H., Diehl, J. A., Majsterek, I. (2016). The Role of the PERK/eIF2alpha/ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med*, 16(6):533-544.
- 257.** Rudert, F. (2000). Genomics and proteomics tools for the clinic. *Curr Opin Mol Ther*, 2(6):633-642.
- 258.** Ruggiero, V., Era, B., Cacace, E., Molin, L., Corda, M., Fais, A., et al. (2014). A preliminary study on serum proteomics in fibromyalgia syndrome. *Clin Chem Lab Med*, 52(9):e207-210. doi:10.1515/cclm-2014-0086
- 259.** Rus, A., Molina, F., Del Moral, M. L., Ramírez-Expósito, M. J., Martínez-Martos, J. M. (2018). Catecholamine and Indolamine Pathway: A Case-Control Study in Fibromyalgia. *Biol Res Nurs*, 20(5):577-586. doi:10.1177/1099800418787672
- 260.** Rus, A., Molina, F., Gasso, M., Camacho, M. V., Peinado, M. A., del Moral, M. L. (2016a). Nitric Oxide, Inflammation, Lipid Profile, and Cortisol in Normal- and Overweight Women With Fibromyalgia. *Biol Res Nurs*, 18(2):138-146.
- 261.** Rus, A., Molina, F., Ramos, M. M., Martínez-Ramírez, M. J., Del Moral, M. L. (2016b). Extra Virgin Olive Oil Improves Oxidative Stress, Functional Capacity, and Health-Related Psychological Status in Patients With Fibromyalgia: A Preliminary Study. *Biol Res Nurs*, 19(1):106-115.
- 262.** Russell, I. J., Orr, M. D., Littman, B., Vipraio, G. A., Alboukrek, D., Michalek, J. E., et al. (1994). Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum*, 37(11):1593-1601.
- 263.** Salvini, S., Sera, F., Caruso, D., Giovannelli, L., Visioli, F., Saieva, C., et al. (2006). Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr*, 95(4):742-751.
- 264.** Sánchez-Domínguez, B., Bullón, P., Román-Malo, L., Marín-Aguilar, F., Alcocer-Gómez, E., Carrión, A. M., et al. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and, inflammation common events in skin of patients with Fibromyalgia. *Mitochondrion*, 21:69-75.
- 265.** Sánchez-Quesada, C., López-Biedma, A., Toledo, E., Gaforio, J. J. (2018). Squalene Stimulates a Key Innate Immune Cell to Foster Wound Healing and Tissue Repair. *Evid Based Complement Alternat Med*, 30(9473094).
- 266.** Sandin, M., Chawade, A., Levander, F. (2015). Is label-free LC-MS/MS ready for biomarker discovery? *Proteomics Clin Appl*, 9(3-4):289-294. doi:10.1002/prca.201400202
- 267.** Scoditti, E., Nestola, A., Massaro, M., Calabriso, N., Storelli, C., De Caterina, R., et al. (2014). Hydroxytyrosol suppresses MMP-9 and COX-2 activity and expression in activated human monocytes via PKCalpha and PKCbeta1 inhibition. *Atherosclerosis*, 232(1):17-24. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.017
- 268.** Schmitz, A. A. P., Govek, E.-E., Böttner, B., Van Aelst, L. (2000). Rho GTPases: Signaling, Migration, and Invasion. *Experimental Cell Research*, 261(1):1-12. doi:https://doi.org/10.1006/excr.2000.5049
- 269.** Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes and Development*, 14(22):2831-2838.
- 270.** Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454(7207):961-967. doi:10.1038/nature07182

- 271.** Sendur, O. F., Turan, Y., Tastaban, E., Yenisey, C., Serter, M. (2009). Serum antioxidants and nitric oxide levels in fibromyalgia: a controlled study. *Rheumatol Int*, 29(6):629-633. doi:10.1007/s00296-008-0738-x
- 272.** Seok, A., Lee, H. J., Lee, S., Lee, J., Mun, S., Park, A., et al. (2017). Identification and Validation of SAA4 as a Rheumatoid Arthritis Prescreening Marker by Liquid Chromatography Tandem-mass Spectrometry. *Molecules*, 22(5). doi:10.3390/molecules22050805
- 273.** Serra, A., Rubio, L., Borrás, X., Maciá, A., Romero, M. P., Motilva, M. J. (2012). Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol Nutr Food Res*, 56(3):486-496. doi:10.1002/mnfr.201100436
- 274.** Serreli, G., Deiana, M. (2018). Biological Relevance of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Metabolites. *Antioxidants (Basel)*, 7(12). doi:10.3390/antiox7120170
- 275.** Shao, B. Z., Xu, Z. Q., Han, B. Z., Su, D. F., Liu, C. (2015). NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol*, 6:262. doi:10.3389/fphar.2015.00262
- 276.** Shen, Y., Li, H., Lu, J., Luo, X., Guan, Q., Cheng, L. (2019). Analytical validation and clinical application of urinary vanillylmandelic acid and homovanillic acid by LC-MS/MS for diagnosis of neuroblastoma. *Biomed Chromatogr*:e4484. doi:10.1002/bmc.4484
- 277.** Shibukawa, Y., Yamazaki, N., Daimon, E., Wada, Y. (2013). Rock-dependent calponin 3 phosphorylation regulates myoblast fusion. *Experimental Cell Research*, 319(5):633-648. doi:10.1016/j.yexcr.2012.12.022
- 278.** Sicras-Mainar, A., Rejas, J., Navarro, R., Blanca, M., Morcillo, A., Larios, R., et al. (2009). Treating patients with fibromyalgia in primary care settings under routine medical practice: a claim database cost and burden of illness study. *Arthritis Res Ther*, 11(2):14.
- 279.** Silva, S., Bronze, M. R., Figueira, M. E., Siwy, J., Mischak, H., Combet, E., et al. (2015a). Impact of a 6-wk olive oil supplementation in healthy adults on urinary proteomic biomarkers of coronary artery disease, chronic kidney disease, and diabetes (types 1 and 2): a randomized, parallel, controlled, double-blind study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 101(1):44-54. doi:10.3945/ajcn.114.094219
- 280.** Silva, S., Sepodes, B., Rocha, J., Direito, R., Fernandes, A., Brites, D., et al. (2015b). Protective effects of hydroxytyrosol-supplemented refined olive oil in animal models of acute inflammation and rheumatoid arthritis. *J Nutr Biochem*, 26(4):360-368. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.11.011
- 281.** Singh, A. K., Shree, S., Chattopadhyay, S., Kumar, S., Gurjar, A., Kushwaha, S., et al. (2017). Small molecule adiponectin receptor agonist GTDF protects against skeletal muscle atrophy. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 439:273-285. doi:10.1016/j.mce.2016.09.013
- 282.** Skaer, T. L. (2014). Fibromyalgia: disease synopsis, medication cost effectiveness and economic burden. *Pharmacoeconomics*, 32(5):457-466. doi:10.1007/s40273-014-0137-y
- 283.** Smeriglio, A., Denaro, M., Mastracci, L., Grillo, F., Cornara, L., Shirooie, S., et al. (2019). Safety and efficacy of hydroxytyrosol-based formulation on skin inflammation: in vitro evaluation on reconstructed human epidermis model. *Daru*. doi:10.1007/s40199-019-00274-3
- 284.** Smith, B. J., Martins-de-Souza, D., Fioramonte, M. (2019). A Guide to Mass Spectrometry-Based Quantitative Proteomics. *Methods Mol Biol*, 1916:3-39. doi:10.1007/978-1-4939-8994-2_1
- 285.** Solitar, B. M. (2010). Fibromyalgia: knowns, unknowns, and current treatment. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 68(3):157-161.
- 286.** Song, P., Meibohm, B., Yates, C. R. (2005). LC/MS/MS in drug development: targeting the brain. *Biotechniques*, Suppl:19-23.
- 287.** Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10(10):712-723. doi:10.1038/nri2852
- 288.** Stattin, E. L., Wiklund, F., Lindblom, K., Onnerfjord, P., Jonsson, B. A., Tegner, Y., et al. (2010). A missense mutation in the aggrecan C-type lectin domain disrupts extracellular matrix interactions and causes dominant familial osteochondritis dissecans. *Am J Hum Genet*, 86(2):126-137. doi:10.1016/j.ajhg.2009.12.018
- 289.** Steel, D. M., Sellar, G. C., Uhlir, C. M., Simon, S., DeBeer, F. C., Whitehead, A. S. (1993). A constitutively expressed serum amyloid A protein gene (SAA4) is closely linked to, and shares structural

similarities with, an acute-phase serum amyloid A protein gene (SAA2). *Genomics*, 16(2):447-454. doi:10.1006/geno.1993.1209

290. Stefan, N.,Stumvoll, M. (2002). Adiponectin--its role in metabolism and beyond. *Hormone and Metabolic Research*, 34(9):469-474. doi:10.1055/s-2002-34785

291. Stoecklacher, J. (2006). The impact of genomics and proteomics in the clinic: functional genetic polymorphisms and their value in response and toxicity prediction in solid tumours. *Ann Oncol*, 17 Suppl 10:x263-268. doi:10.1093/annonc/mdl271

292. Storniolo, C. E.,Rosello-Catafau, J.,Pintó, X.,Mitjavila, M. T.,Moreno, J. J. (2014). Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biol*, 2:971-977. doi:10.1016/j.redox.2014.07.001

293. Stournaras, D.,Petrovic, K. (2019). Fibromyalgia treatment and management considerations for nurse practitioners. *J Am Assoc Nurse Pract*. doi:10.1097/jjnx.0000000000000178

294. Strathmann, F. G.,Hoofnagle, A. N. (2011). Current and future applications of mass spectrometry to the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol*, 136(4):609-616. doi:10.1309/ajcpw0ta8obbngck

295. Strimbu, K.,Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6):463-466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177

296. Suk, J. H.,Lee, J. H.,Kim, J. M. (2012). Association between thyroid autoimmunity and fibromyalgia. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 120(7):401-404. doi:10.1055/s-0032-1309008

297. Sumi, T.,Matsumoto, K.,Takai, Y.,Nakamura, T. (1999). Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *The Journal of cell biology*, 147(7):1519-1532. doi:10.1083/jcb.147.7.1519

298. Sumpton, J. E.,Moulin, D. E. (2014). Fibromyalgia. *Handb Clin Neurol*, 119:513-527.

299. Takeuchi, H.,Suzuki, N.,Tada, M.,He, P. (2001). Accelerative effect of olive oil on liver glycogen synthesis in rats subjected to water-immersion restraint stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(7):1489-1494.

300. Tam, E. M.,Morrison, C. J.,Wu, Y. I.,Stack, M. S.,Overall, C. M. (2004). Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18):6917-6922. doi:10.1073/pnas.0305862101

301. Taylor, A. G.,Fischer-White, T. G.,Anderson, J. G.,Adelstein, K. E.,Murugesan, M.,Lewis, J. E., et al. (2016). Stress, Inflammation and Pain: A Potential Role for Monocytes in Fibromyalgia-related Symptom Severity. *Stress Health*, 32(5):503-513. doi:10.1002/smi.2648

302. Tinkle, B. T.,Bird, H. A.,Grahame, R.,Lavalley, M.,Levy, H. P.,Sillence, D. (2009). The lack of clinical distinction between the hypermobility type of Ehlers-Danlos syndrome and the joint hypermobility syndrome (a.k.a. hypermobility syndrome). *Am J Med Genet A*, 149A(11):2368-2370. doi:10.1002/ajmg.a.33070

303. Toledo, E.,Wang, D. D.,Ruiz-Canela, M.,Clish, C. B.,Razquin, C.,Zheng, Y., et al. (2017). Plasma lipidomic profiles and cardiovascular events in a randomized intervention trial with the Mediterranean diet. *Am J Clin Nutr*, 106(4):973-983. doi:10.3945/ajcn.116.151159

304. Torres, X., Collado, A., Gomez, E., Arias, A., Cabrera-Villalba, S., Messina, O. D., et al. (2013). The Spanish version of the Fibromyalgia Rapid Screening Tool: translation, validity and reliability. *Rheumatology (Oxford)*, 52(12), 2283-2291.

305. Tosti, V.,Bertozzi, B.,Fontana, L. (2018). Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 73(3):318-326. doi:10.1093/gerona/glx227

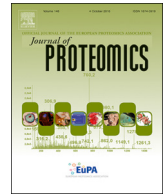
306. Traynor, L. M.,Thiessen, C. N.,Traynor, A. P. (2011). Pharmacotherapy of fibromyalgia. *Am J Health Syst Pharm*, 68(14):1307-1319. doi:10.2146/ajhp100322

- 307.** Trujillo, J., Molina-Jijon, E., Medina-Campos, O. N., Rodriguez-Munoz, R., Reyes, J. L., Loredó, M. L., et al. (2016). Curcumin prevents cisplatin-induced decrease in the tight and adherens junctions: relation to oxidative stress. *Food Funct*, 7(1):279-293. doi:10.1039/c5fo00624d
- 308.** Tuck, K. L., Freeman, M. P., Hayball, P. J., Stretch, G. L., Stupans, I. (2001). The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *The Journal of nutrition*, 131(7):1993-1996. doi:10.1093/jn/131.7.1993
- 309.** Turer, A. T., Scherer, P. E. (2012). Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia*, 55(9):2319-2326. doi:10.1007/s00125-012-2598-x
- 310.** Turnham, R. E., Scott, J. D. (2016). Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. *Gene*, 577(2):101-108. doi:10.1016/j.gene.2015.11.052
- 311.** Uhlar, C. M., Burgess, C. J., Sharp, P. M., Whitehead, A. S. (1994). Evolution of the serum amyloid A (SAA) protein superfamily. *Genomics*, 19(2):228-235. doi:10.1006/geno.1994.1052
- 312.** Valenzuela, M. T., Nunez, M. I., Villalobos, M., Siles, E., Olea, N., Pedraza, V., et al. (1995). Relationship between doxorubicin cell sensitivity, drug-induced DNA double-strand breaks, glutathione content and P-glycoprotein in mammalian tumor cells. *Anticancer Drugs*, 6(6):749-757.
- 313.** van Buul, J. D., Timmerman, I. (2016). Small Rho GTPase-mediated actin dynamics at endothelial adherens junctions. *Small GTPases*, 7(1):21-31. doi:10.1080/21541248.2015.1131802
- 314.** van Diepen, J. A., Berbee, J. F., Havekes, L. M., Rensen, P. C. (2013). Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 228(2):306-315. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.028
- 315.** van Miert, A. S. (1995). Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. *Veterinary Quarterly*, 17(2):41-50. doi:10.1080/01652176.1995.9694530
- 316.** Vassilopoulos, S., Gentil, C., Laine, J., Buclez, P. O., Franck, A., Ferry, A., et al. (2014). Actin scaffolding by clathrin heavy chain is required for skeletal muscle sarcomere organization. *The Journal of cell biology*, 205(3):377-393. doi:10.1083/jcb.201309096
- 317.** Vieira-Potter, V. J. (2014). Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. *Cell Microbiol*, 16(10):1484-1492. doi:10.1111/cmi.12336
- 318.** Vilagut, G., Valderas, J. M., Ferrer, M., Garin, O., Lopez-Garcia, E., Alonso, J. (2008). [Interpretation of SF-36 and SF-12 questionnaires in Spain: physical and mental components]. *Med Clin (Barc)*, 130(19):726-735. doi:S0025-7753(08)71563-X [pii]
- 319.** Violante, B., Gerbaudo, L., Borretta, G., Tassone, F. (2009). Effects of extra virgin olive oil supplementation at two different low doses on lipid profile in mild hypercholesterolemic subjects: a randomised clinical trial. *Journal of Endocrinological Investigation*, 32(10):794-796. doi:10.1007/bf03345747
- 320.** Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, G., Galli, C. (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, 117(1):25-32.
- 321.** Visioli, F., Poli, A., Gall, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev*, 22(1):65-75.
- 322.** Wåhlén, K., Olausson, P., Carlsson, A., Ghafouri, N., Gerdle, B., Ghafouri, B. (2017). Systemic alterations in plasma proteins from women with chronic widespread pain compared to healthy controls: a proteomic study. *J Pain Res*, 10:797-809. doi:10.2147/jpr.s128597
- 323.** Wallace, D. J., Gavin, I. M., Karpenko, O., Barkhordar, F., Gillis, B. S. (2015). Cytokine and chemokine profiles in fibromyalgia, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a potentially useful tool in differential diagnosis. *Rheumatol Int*, 35(6):991-996. doi:10.1007/s00296-014-3172-2
- 324.** Wallace, D. J., Silverman, S. L., Conklin, J., Barken, D., Dervieux, T. (2016). Systemic lupus erythematosus and primary fibromyalgia can be distinguished by testing for cell-bound complement activation products. *Lupus Sci Med*, 3(1):e000127. doi:10.1136/lupus-2015-000127

- 325.** Wan, G.,Zhaorigetu, S.,Liu, Z.,Kaini, R.,Jiang, Z.,Hu, C. A. (2008). Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31):21540-21549. doi:10.1074/jbc.M800214200
- 326.** Wang, H.,Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*, 27(5-6):612-616. doi:S0891-5849(99)00107-0 [pii]
- 327.** Wang, N.,Liu, Y.,Ma, Y.,Wen, D. (2018). Hydroxytyrosol ameliorates insulin resistance by modulating endoplasmic reticulum stress and prevents hepatic steatosis in diet-induced obesity mice. *J Nutr Biochem*, 57:180-188. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.03.018
- 328.** Wang, Y.,Reheman, A.,Spring, C. M.,Kalantari, J.,Marshall, A. H.,Wolberg, A. S., et al. (2014). Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10):4281-4293. doi:10.1172/jci74630
- 329.** Warleta, F.,Quesada, C. S.,Campos, M.,Allouche, Y.,Beltrán, G.,Gaforio, J. J. (2011). Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients*, 3(10):839-857. doi:10.3390/nu3100839
- 330.** Weathington, N. M.,van Houwelingen, A. H.,Noerager, B. D.,Jackson, P. L.,Kraneveld, A. D.,Galín, F. S., et al. (2006). A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nature Medicine*, 12(3):317-323. doi:10.1038/nm1361
- 331.** Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphic for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
- 332.** Wiik, A.,Fritsler, M. (2008). Laboratory tests in rheumatic disorders. en: HOCHBERG, M. C., SILMAN, A. J., SMOLEN, J. S., WEINBLATT, M. E.,WEISMAN, M. H. (eds.) Rheumatology. Edición ed. Philadelphia: Content Repository Only!
- 333.** Wisniewski, J. R.,Zougman, A.,Nagaraj, N.,Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 6(5):359-362. doi:10.1038/nmeth.1322 nmeth.1322 [pii]
- 334.** Wolfe, F. (1990). Fibromyalgia. *Rheum Dis Clin North Am*, 16(3):681-698.
- 335.** Wolfe, F.,Clauw, D. J.,Fitzcharles, M. A.,Goldenberg, D. L.,Haüser, W.,Katz, R. S., et al. (2011). Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. *J Rheumatol*, 38(6):1113-1122.
- 336.** Wolfe, F.,Smythe, H. A.,Yunus, M. B.,Bennett, R. M.,Bombardier, C.,Goldenberg, D. L., et al. (1990). The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatology*, 33(2):160-172.
- 337.** World Health Organization. (2018). International Classification of Diseases for Mortality and Morbidity Statistics: ICD Eleventh Edition [Online]. World Health Organization. Disponible en: <https://www.who.int/classifications/icd/en/> [Recuperado el 20 de mayo 2019].
- 338.** www.clinicaltrials.gov/. (NCT00933686). Growth Hormone in Neuroendocrine Dysfunction With Severe Fibromyalgia Syndrome [Online]. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00933686>. [Recuperado el 15 de abril 2019].
- 339.** www.clinicaltrials.gov/. (NCT03249103). Evaluate the Efficacy and Safety of NYX-2925 in Subjects With Fibromyalgia [Online]. Disponible en: www.clinicaltrials.gov/show/NCT03249103 [Recuperado el 15 de abril 2019].
- 340.** Yen, C.-F.,Wang, H.-S.,Lee, C.-L.,Liao, S.-K. (2014). Roles of integrin-linked kinase in cell signaling and its perspectives as a therapeutic target. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*, 3(3):67-72. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gmit.2014.06.002>
- 341.** Yoshida, Y.,Niki, E.,Noguchi, N. (2003). Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chem Phys Lipids*, 123(1):63-75.
- 342.** Yoshikawa, T.,Shimano, H.,Amemiya-Kudo, M.,Yahagi, N.,Hasty, A. H.,Matsuzaka, T., et al. (2001). Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 21(9):2991-3000. doi:10.1128/mcb.21.9.2991-3000.2001
- 343.** Yubero-Serrano, E. M.,López-Moreno, J.,Gómez-Delgado, F.,López-Miranda, J. (2018). Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *Eur J Clin Nutr*. doi:10.1038/s41430-018-0304-x

- 344.** Zabihyeganeh, M., Vafae Afshar, S., Amini Kadijani, A., Jafari, D., Bagherifard, A., Janbozorgi, M., et al. (2019). The effect of cognitive behavioral therapy on the circulating proinflammatory cytokines of fibromyalgia patients: A pilot controlled clinical trial. *Gen Hosp Psychiatry*, 57:23-28. doi:10.1016/j.genhosppsych.2019.01.003
- 345.** Zamurs, L. K., Idoate, M. A., Hanssen, E., Gomez-Ibanez, A., Pastor, P., Lamande, S. R. (2015). Aberrant mitochondria in a Bethlem myopathy patient with a homozygous amino acid substitution that destabilizes the collagen VI alpha2(VI) chain. *Journal of Biological Chemistry*, 290(7):4272-4281. doi:10.1074/jbc.M114.632208
- 346.** Zazpe, I., Sanchez-Tainta, A., Estruch, R., Lamuela-Raventos, R. M., Schroder, H., Salas-Salvado, J., et al. (2008). A large randomized individual and group intervention conducted by registered dietitians increased adherence to Mediterranean-type diets: the PREDIMED study. *J Am Diet Assoc*, 108(7):1134-1144; discussion 1145. doi:10.1016/j.jada.2008.04.011
- 347.** Zerlauth, G., Wolf, G. (1984). Plasma fibronectin as a marker for cancer and other diseases. *American Journal of Medicine*, 77(4):685-689. doi:10.1016/0002-9343(84)90366-8
- 348.** Zhang, R., Yang, D., Zhou, C., Cheng, K., Liu, Z., Chen, L., et al. (2012). beta-actin as a loading control for plasma-based Western blot analysis of major depressive disorder patients. *Analytical Biochemistry*, 427(2):116-120. doi:10.1016/j.ab.2012.05.008
- 349.** Zhang, X., Cao, J., Zhong, L. (2009). Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 379(6):581-586. doi:10.1007/s00210-009-0399-7
- 350.** Zheng, A., Li, H., Xu, J., Cao, K., Li, H., Pu, W., et al. (2015). Hydroxytyrosol improves mitochondrial function and reduces oxidative stress in the brain of db/db mice: role of AMP-activated protein kinase activation. *The British journal of nutrition*, 113(11):1667-1676. doi:10.1017/s0007114515000884
- 351.** Zhi, L. Q., Yao, S. X., Liu, H. L., Li, M., Duan, N., Ma, J. B. (2018). Hydroxytyrosol inhibits the inflammatory response of osteoarthritis chondrocytes via SIRT6-mediated autophagy. *Mol Med Rep*, 17(3):4035-4042. doi:10.3892/mmr.2017.8353
- 352.** Zhu, L., Liu, Z., Feng, Z., Hao, J., Shen, W., Li, X., et al. (2010). Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *J Nutr Biochem*, 21(11):1089-1098. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.09.006
- 353.** Zigrino, P., Brinckmann, J., Niehoff, A., Lu, Y., Giebeler, N., Eckes, B., et al. (2016). Fibroblast-Derived MMP-14 Regulates Collagen Homeostasis in Adult Skin. *The Journal of investigative dermatology*, 136(8):1575-1583. doi:10.1016/j.jid.2016.03.036
- 354.** Zou, Y., Zwolanek, D., Izu, Y., Gandhy, S., Schreiber, G., Brockmann, K., et al. (2014). Recessive and dominant mutations in COL12A1 cause a novel EDS/myopathy overlap syndrome in humans and mice. *Human Molecular Genetics*, 23(9):2339-2352. doi:10.1093/hmg/ddt627

PUBLICACIÓN



Insight into the biological pathways underlying fibromyalgia by a proteomic approach



Jorge A. Ramírez-Tejero^a, Esther Martínez-Lara^a, Alma Rus^b, María Victoria Camacho^c,
María Luisa Del Moral^a, Eva Siles^{a,*}

^a Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén, Spain

^b Departamento de Biología Celular, Universidad de Granada, Spain

^c Unidad de Gestión Clínica de Laboratorios, Complejo Hospitalario de Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Fibromyalgia
Plasma protein signature
Pathogenesis
Inflammation

ABSTRACT

Fibromyalgia (FM) is a form of non-articular rheumatism difficult to diagnose and treat because its etiology remains still elusive. Proteomics makes possible the systematic analysis of hundreds of proteins in clinical samples. Consequently, it has become a key tool for finding altered molecular pathways in different diseases. In this context, the present study analyzes changes in the plasma proteome of patients with FM by nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Deregulated proteins were studied using Ingenuity Pathways Analysis (IPA) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Conventional analytical methods were used to validate selected proteins. We found a total of 33 proteins differentially expressed in patients with FM. Haptoglobin and fibrinogen showed the highest FM/control ratio. IPA analysis revealed that the top enriched canonical pathways were acute-phase response signaling, Liver-X Receptor/Retinoid-X Receptor activation, Farnesoid-X Receptor/Retinoid-X Receptor activation, and coagulation and complement systems. The importance of inflammation in FM was corroborated by the increase in erythrocyte sedimentation rate. In conclusion, our results support the existence of a plasma protein signature of FM that involves different biological pathways all of them related to inflammation, and point to haptoglobin and fibrinogen as plausible biomarker-candidates for future studies.

Significance: The etiology of fibromyalgia (FM) remains elusive making its diagnosis and treatment difficult. The characterization of the proteome signature of this syndrome will improve its understanding. However, to date proteomic analyses in FM are scarce. The goal of the present work is to analyse, for the first time, changes in plasma protein profiles of patients with FM in comparison to control subjects, using label free relative protein quantification by nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Our data demonstrate the existence of a common protein signature in the plasma of patients with FM that could explain some of the symptoms associated to this syndrome. The analysis of the 33 proteins differentially expressed corroborates the crucial role of inflammation in the pathogenesis of this syndrome. The interplay of the complement and coagulation cascades contributes to the inflammatory process, while the activation of Liver-X Receptor/Retinoid-X Receptor and Farnesoid-X Receptor/Retinoid-X Receptor could attempt to alleviate it. Finally, we have identified two proteins, haptoglobin and fibrinogen, as potential biomarker-candidates of FM for future studies.

1. Introduction

Fibromyalgia (FM) is a form of non-articular rheumatism, with an estimated prevalence in the general population of 1.7–5.4% and a ratio of females to males of 2.3–13.7 to 1, according to the different classification criteria sets available [1]. This syndrome is characterized by chronic musculoskeletal pain and fatigue with significantly impaired function and quality of life. Moreover, it is also frequently associated

with sleep problems, morning stiffness, cognitive impairment, headache, depression, and anxiety [2] that, altogether, lead to activity limitations and impaired work ability.

Although the etiology of FM remains still elusive, several factors have been proposed to be involved. Patients' relatives have a higher risk of developing this syndrome compared to the general population [3], consequently there seem to be a genetic predisposition to FM. In this line, gene polymorphisms in the serotonin receptor 2A region of

* Corresponding author at: Dept. of Experimental Biology, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain.

E-mail address: esiles@ujaen.es (E. Siles).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.07.009>

Received 20 December 2017; Received in revised form 16 March 2018; Accepted 16 July 2018

Available online 17 July 2018

1874-3919/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

chromosome 13, the serotonin transporter gene regulatory region, the catecholamine methyltransferase, the dopamine-D-3 receptor and the adrenergic receptor have been related to an increased risk of FM [3]. The cognitive and behavioral responses observed in FM have also been linked to glutamatergic hyperactivity. In fact, a recent and thorough review in this field suggests that there is a significant association between increased cerebral glutamate levels and this syndrome [4]. FM and other related pathologies, such as Chronic Fatigue Syndrome, have also been associated with neuroendocrine disorders [5]. Particularly, an exacerbated hypothalamic-pituitary-adrenal axis and an alteration in cortisol levels have been proposed to be involved in FM [6]. However, among all the possible factors that could underlay FM pathophysiology, inflammation and oxidative stress are the most frequently reported. Our research group, among others, found correlations between a pro-oxidative status and a decreased antioxidant capacity in patients with FM [7–9]. Moreover, features related with a pro-oxidative and a pro-inflammatory status, like increased levels of inflammatory markers, lower zinc levels or an augmented lipid peroxidation, seem to be common in these patients. Based on these data, it seems unlikely that FM is caused exclusively by the dysregulation of a single factor. This multifactorial nature makes its treatment highly complex. Therefore, symptomatic medication is at present the main form of treatment, although it often causes adverse effects in these patients.

The lack of known etiology also makes the diagnosis of this syndrome difficult. In fact, nowadays FM takes up to 5 years to be diagnosed, making it imperative to find markers that help in its diagnosis and treatment. Proteomic is a key tool in health research because it makes possible the systematic analysis of hundreds of proteins in clinical samples, with the promise of discovering new biomarkers or altered molecular pathways for different disease conditions. To date, proteomic analyses in FM are scarce. Two studies performed in salivary fluid of patients with FM [10, 11] showed differentially expressed proteins related to oxidative stress, cytoskeletal arrangements and central sensitization in these patients compared to healthy controls. In a preliminary study on serum proteomics of patients with FM, Ruggiero et al. [12] found a significant overexpression of three proteins related to oxidative stress: α 1-antitrypsin, transthyretin and retinol binding protein 4. A more recent study in muscle of women diagnosed of chronic widespread pain including FM, showed altered levels of stress and inflammation proteins that correlated with pain intensity [13]. With this background, the goal of the present work is to analyse, for the first time, changes in plasma protein profiles in patients with FM using label free relative protein quantification by nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (NanoLC-MS/MS). This approximation may help to gain insight into the biological pathways potentially related to the FM process and to set a common protein signature in order to improve the diagnosis and management of this syndrome.

2. Material and methods

2.1. Patients and samples

This study was carried out in two groups: 12 age-matched healthy women recruited from the University of Jaén (Spain), and 12 age-matched FM patients from AFIXA (Association of Fibromyalgia of Jaén). All subjects provided written informed consent. The study was approved by the Ethics and Research Committee of the Complejo Hospitalario de Jaén (Spain) and carried out in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association. The inclusion criterion for the FM group was to meet the 1990 American College of Rheumatology (ACR) Criteria for classification of primary FM [14]. Exclusion criteria for the study included the presence of any other chronic disease (diabetes mellitus, hypertension, cancer, ischemic heart disease), pregnancy, lactation, and grade II obesity (with a body mass index (BMI) ≥ 35 kg/m²). None of the participants were using any medicine that affects the antioxidative status, or were under the

Table 1
Demographic and clinical data of patients with FM and healthy controls.

Variable	FM group	Control group	p value
Age (years)	50.58 \pm 6.27	47.58 \pm 7.94	0.316
FIQ score	52.38 \pm 17.07	–	–
VAS score	5.62 \pm 2.83	–	–
PCS-12 score	33.53 \pm 9.16	55.08 \pm 2.52	< 0.001
MCS-12 score	38.53 \pm 13.99	50.48 \pm 5.75	0.049

Values represent mean \pm SD.

treatment of corticosteroids, estrogens, analgesics or anti-inflammatory drugs. None was consuming alcohol, and all of them were non-smokers. All the participants were sedentary living women. The clinical and demographic characteristics of each participant were acquired through interviews and questionnaires (Table 1, Supplementary Table 1). In order to avoid variations, all the procedures and tests were carried out by the same specialist. In patients with FM, the FM impact questionnaire (FIQ) was used to evaluate functional capacity in daily living activities. Musculoskeletal pain was assessed by a visual analogue scale (VAS; 10 cm). The mental (Mental Component Summary, MCS12) and physical (Physical Component Summary, PCS12) health status of the participants was determined by the Spanish version of SF-12 Health Survey [15]. The lower score between 0 and 100 meant worse health status. The mental (MCS-12) and physical (PCS-12) health status were significantly lower in the FM group compared to healthy volunteers ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively).

Blood samples from patients were extracted at the same time in the early morning to avoid daily variations of the parameters, and after an overnight fast. The blood was disposed in EDTA tubes and EDTA-free tubes to obtain plasma (for proteomic analysis and fibrinogen quantitation) and serum samples (for haptoglobin quantitation), respectively. After centrifugation for 10 min at 1300g and 4 °C, supernatants were harvested, aliquoted and stored at -80 °C until used. Whole blood samples were also recollected and immediately used to evaluate Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR).

2.2. NanoLC-MS/MS analysis

Plasma was depleted using Pierce top 12 abundant protein depletion spin columns, following manufacturer's instructions. Depleted protein samples were tryptically digested following the filter-aided sample preparation (FASP) protocol described by Wisniewski et al. with minor variations [16]. The resulting peptides were dried and resuspended in 0.1% formic acid, and sonicated for 5 min prior to mass spectrometry analysis. Peptide mixtures were separated on a nanoACQUITY UPLC System (Waters) connected to an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Electron) or a Synapt G2 Si (Waters). An aliquot of each sample was loaded onto a Symmetry 300 C18 UPLC Trap column (180 μ m \times 20 mm, 5 μ m; Waters). The precolumn was connected to a BEH130 C18 column, 75 μ m \times 200 mm, 1.7 μ m (Waters), and equilibrated in 3% acetonitrile and 0.1% FA. Peptides were eluted directly into the nanoelectrospray capillary (Proxeon Biosystems) at 300 nL/min, using a 120 min linear gradient of 3–50% acetonitrile. The Orbitrap XL ETD mass spectrometer (Thermo) automatically switched between MS and MS/MS acquisition in data-dependent acquisition (DDA) mode, in an alternating fashion. Full MS survey spectra (m/z 400–2000) were acquired in the Orbitrap with 30,000 resolution at m/z 400, and two lock-masses were used for increased mass measurement accuracy (445.120024 and 462.146573). The six most intense ions were subjected to collision-induced dissociation (CID) in the linear ion trap. Precursors with charge states of 2 and 3 were specifically selected for fragmentation. Analyzed ions were excluded from further analysis during 30 s using dynamic exclusion lists.

Database searches were performed using the software Proteome Discoverer v.1.4 (Thermo Fisher Scientific).

Table 2
Proteins differentially expressed in the plasma of patients with FM.

Uniprot ID	Protein name	Abbreviation	Gene name	Ratio (FM/Healthy)	p value
P00738	Haptoglobin	HPT	HP	2.54	7.95E-05
P02679	Fibrinogen gamma chain	FIBG	FGG	2.30	5.49E-03
P60709	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	ACTB	2.26	1.11E-03
P07996	Thrombospondin-1	TSP1	THBS1	2.21	3.33E-02
Q14791	Apolipoprotein L1	APOL1	APOL1	1.91	3.77E-04
P35542	Serum amyloid A-4 protein	SAA4	SAA4	1.89	3.43E-03
P02655	Apolipoprotein C-II	APOC2	APOC2	1.83	1.15E-02
P02787	Serotransferrin	TRFE	TF	1.83	1.30E-03
P02675	Fibrinogen beta chain	FIBB	FGB	1.78	4.38E-02
P20742	Pregnancy zone protein	PZP	PZP	1.76	4.05E-03
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	A1AG2	ORM2	1.74	4.58E-03
P01876	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	IGHA1	1.74	3.09E-02
P00742	Coagulation factor X	FA10	F10	1.63	9.92E-03
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	A1AG1	ORM1	1.58	2.27E-02
P01023	Alpha-2-macroglobulin	A2M	A2M	1.52	1.20E-02
P01871	Ig mu chain C region	IGHM	IGHM	1.52	2.24E-02
P09871	Complement C1s subcomponent	C1S	C1S	1.49	1.23E-04
P02743	Serum amyloid P-component	SAMP	APCS	1.48	2.44E-02
P08603	Complement factor H	CFAH	CFH	1.43	4.20E-03
P10643	Complement component C7	CO7	C7	1.39	9.26E-03
P06681	Complement C2	CO2	C2	1.38	9.72E-03
P07225	Vitamin K-dependent protein S	PROS	PROS1	1.38	1.06E-02
P00740	Coagulation factor IX	FA9	F9	1.36	7.09E-03
P02747	Complement C1q subcomponent subunit C	C1QC	C1QC	1.35	1.55E-02
P02748	Complement component C9	CO9	C9	1.33	7.31E-03
P01019	Angiotensinogen	ANGT	AGT	0.73	3.98E-02
P04196	Histidine-rich glycoprotein	HRG	HRG	0.70	2.90E-02
P08571	Monocyte differentiation antigen CD14	CD14	CD14	0.67	5.95E-03
P08185	Corticosteroid-binding globulin	CBG	SERPINA6	0.66	2.78E-02
P05543	Thyroxine-binding globulin	THBG	SERPINA7	0.63	5.93E-03
Q9UK55	Protein Z-dependent protease inhibitor	ZPI	SERPINA10	0.63	1.29E-02
Q9UGM5	Fetuin-B	FETUB	FETUB	0.53	3.75E-03
P00915	Carbonic anhydrase 1	CA1	CA1	0.47	4.06E-03

2.3. Differential expression analysis

Progenesis LC-MS software (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) was used to analyse protein variation among samples. Raw files were directly loaded onto the program and analyzed following the workflow provided by the manufacturers. One of the samples was selected as a reference run to which the precursor masses in all the other samples were aligned to. Abundance ratios between the run to be aligned and the reference run, were calculated for all features at given retention times. Protein identifications were performed using Mascot search engine v2.1 (Matrix Science). Carbamidomethylation of cysteines was set as fixed modification, and oxidation of methionines as variable modification, and 2 missed cleavages were allowed. 10 ppm of peptide mass tolerance and 0.5 Da fragment mass tolerance were used. Spectra were searched against Uniprot/Swissprot database version 2016_02 restricted to *Homo sapiens*. A decoy search was carried out in order to estimate the false discovery rate (FDR). Only peptides with a false discovery rate of < 1% were selected. Protein quantitation was performed using the information concerning to the three most intense peptides (when available), and only proteins with ANOVA $p < 0.05$ and ratio > 1.2 in either direction and at least two peptides at a FDR < 1%, were considered as significantly deregulated. The normalized relative abundance of every protein was expressed as mean \pm standard deviation (SD).

2.4. Network analysis

Deregulated proteins in FM were studied by using the Canonical Pathways, Diseases & Functions and Network-building tools, Ingenuity Pathways Analysis (IPA; Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) mapper –Search pathway tool (http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html) was also used.

2.5. ESR, fibrinogen and haptoglobin determination

ESR was assessed with BD Seditainer™ tubes in a BD Vacutainer® Sedi-15™ analyzer (Becton Dickinson). Fibrinogen was determined by the Multifibren®U reagent (Dade Behring Holdings, Inc.) in a BCS XP System analyzer (Siemens). Haptoglobin concentration was quantified by immunoturbidimetry (Tina-quant Haptoglobin test, Roche Diagnostics®) in a Roche/Hitachi MODULAR P analyzer.

2.6. Statistical analysis of clinical data

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Management and data analysis were performed using the statistical package SPSS for Windows version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Kolmogorov-Smirnov test (α -value = 0.05) and Levene test (α -value = 0.05) were performed to test normality and homoscedasticity, respectively. Data which followed a normal distribution and the principle of homoscedasticity of variances were tested by an unpaired Student's *t*-test to compare differences between means. The degree of statistical significance in data which did not follow a normal distribution or the principle of homoscedasticity (ESR, fibrinogen, PCS-12, MCS-12) was established by applying the Mann-Whitney *U*-test. To assess the relation between variables, Pearson or Spearman correlation was used. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Plasma proteome profiling in fibromyalgia

The proteomic profile of plasma samples from healthy controls and patients with FM was determined by NanoLC-MS/MS. A total of 266 proteins were identified. Using a cutoff value of 1% FDR for statistical significance, 33 of these proteins were found to be differentially

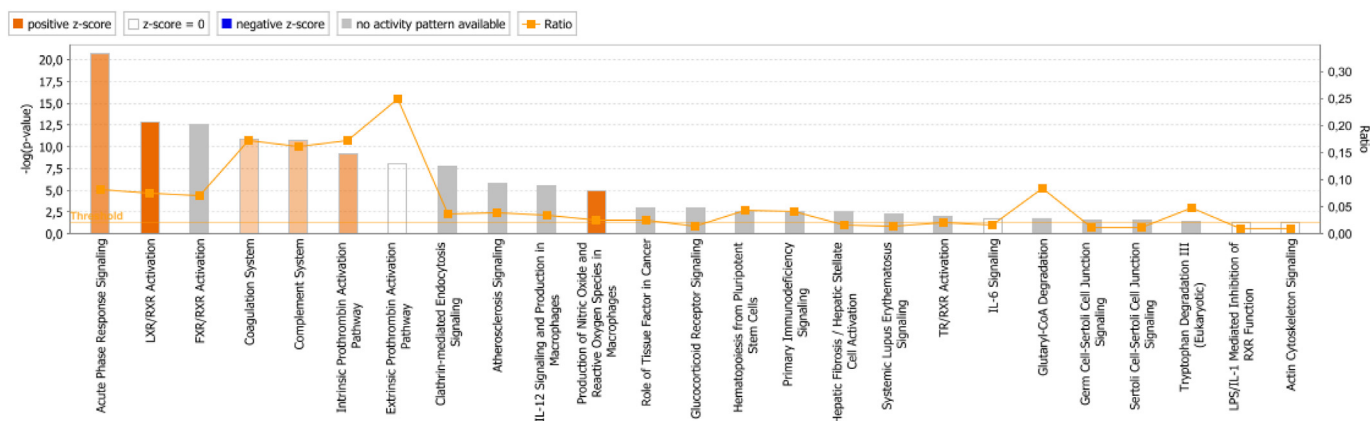


Fig. 1. Canonical pathways enriched in fibromyalgia sorted by statistical significance. Orange or blue colours mean positive or negative Z-score, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

expressed (Table 2): 25 significantly overexpressed (FM/control ratio ≥ 1.20) and 8 underexpressed (FM/control ratio ≤ 0.80).

3.2. Network and pathway analysis of proteins differentially expressed

We used an IPA analysis in order to assess whether the proteins with different abundance were related to specific molecular pathways and networks. In the pathway analysis, we found 25 statistically significant enriched canonical pathways associated with the 33 deregulated plasma proteins of FM patients (Fig. 1). Among these, the top 5 according to the p -value were acute-phase response signaling (14 proteins: HPT, FIBB, FIBG, SAA4, TRFE, A1AG1, A1AG2, C1S, CO2, CO9, A2M, SAMP, HRG and ANGT; Fig. 2A), Liver-X Receptor/Retinoid-X Receptor (LXR/RXR) activation (9 proteins: APOL1, TRFE, A1AG1, A1AG2, CO9, CD14, APOC2, SAA4 and ANGT), Farnesoid-X Receptor/Retinoid-X Receptor (FXR/RXR) activation (9 proteins: APOL1, TRFE, A1AG1, A1AG2, CO9, FETUB, APOC2, SAA4 and ANGT), coagulation system (7 proteins: FIBB, FIBG, FA10, FA9, A2M, PROS, ZPI) and complement system (6 proteins: C1S, CFAH, CO7, CO2, C1QC, CO9). The highest ratio corresponded to the extrinsic prothrombin activation pathway. The LXR/RXR activation and production of nitric oxide and reactive oxygen species in macrophages showed a Z-score > 2 ($Z = 2.333$; $p = 1.58E-13$ and $Z = 2.236$; $p = 1.20E-5$, respectively). Using the Disease & Biofunction tool we found that coagulation was activated in patients with FM, while bleeding was inhibited (Fig. 2B). This result was corroborated by the KEGG mapper –Search pathway tool (Fig. 3).

For the network analysis, proteins linked with developmental disorder, hereditary disorder and immunological disease were gathered, and the majority of the proteins resulted to be connected to pro-inflammatory cytokines and ERK-1/2 network (Fig. 4).

3.3. Haptoglobin, fibrinogen and ESR determination

Haptoglobin and fibrinogen are the two proteins with the highest FM/control ratio. Given their involvement in the acute-phase response and in the coagulation cascade, two of the canonical pathways enriched in patients with FM, we next confirmed their overexpression. In agreement with the NanoLC-MS/MS results, the levels of haptoglobin and fibrinogen in patients with FM were significantly increased ($p < 0.02$ and $p < 0.05$, respectively; Table 3).

ESR can indirectly measure the activation of acute-phase response. As shown in Table 3, ESR was also significantly increased in patients with FM compared to controls ($p < 0.05$). These inflammatory clinical data (haptoglobin, fibrinogen, and ESR) positively correlated with the proteomic results (Table 4).

4. Discussion

We performed, for the first time, NanoLC-MS/MS analysis in the plasma from FM patients and age-matched healthy volunteers. We found a total of 33 proteins with different abundance in patients with FM. Most of the proteins were related to inflammation processes and, among others, five dominant pathways according to its p -value were identified as enriched: the acute phase response signaling, LXR/RXR activation, FXR/RXR activation, coagulation system and complement system.

Our comparative IPA analysis showed 14 proteins related with the acute-phase response signaling, 12 significantly more abundant (HPT, FIBB/FIBG, SAA4, TRFE, A1AG1, A1AG2, C1S, CO2, CO9, A2M, SAMP) and 2 significantly less abundant (HRG, ANGT) in FM. The acute-phase response is a complex mechanism from the organism against local or systemic disturbances that occurs, among others, during inflammatory processes [17]. In these processes, the tissular damage leads to the release of pro-inflammatory cytokines which, together with nitric oxide and glucocorticoids, control the hepatic synthesis of the acute-phase reactants [18–20]. The acute-phase reactants include proteins whose plasma concentrations increase (positive reactants) or decrease (negative reactants) significantly. In our study, we identified 11 positive acute-phase reactants upregulated and 1 negative acute-phase reactant downregulated. The activation of this response can be indirectly measured by ESR, and we have also detected a statistically significant increase in ESR in FM. Altogether, these results suggest the involvement of an inflammatory response in FM, even though TRFE, a negative reactant, was increased and ANGT, a positive reactant, was decreased. Similar discordances have been previously reported, as not all the acute-phase reactants increase uniformly [21]. In fact, as proposed by Baralla et al. in the inflammatory context of chronic pulmonary disease [22], the increase of TRFE may reflect an attempt to preserve from the deleterious effects of free iron. Acute-phase response is traditionally associated with a high level of C-reactive Protein (CRP) and several interleukins. However, our results do not show changes in any of these proteins. In this sense, Bazzichi et al. [23] reported that only the 25% of the FM patients exhibited high levels of CRP, and no correlation with CRP level has been described in other typical inflammatory diseases, such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE) [24]. Similarly, published data do not show a consistent interleukin pattern in FM either. Some authors found higher levels of IL-10, IL-8 and TNF- α in this condition [23]. Contrary and supporting our findings, Wallace et al. [25] were unable to describe higher levels of IL-6 and IL-8 in FM patients compared to healthy controls. Likewise, Kasiphaz et al. [26] highlighted that the alteration in cytokine production was not a dominant factor in the pathogenesis of FM. These conflicting results may underlie the existence of a chronic inflammatory state. This situation associates with

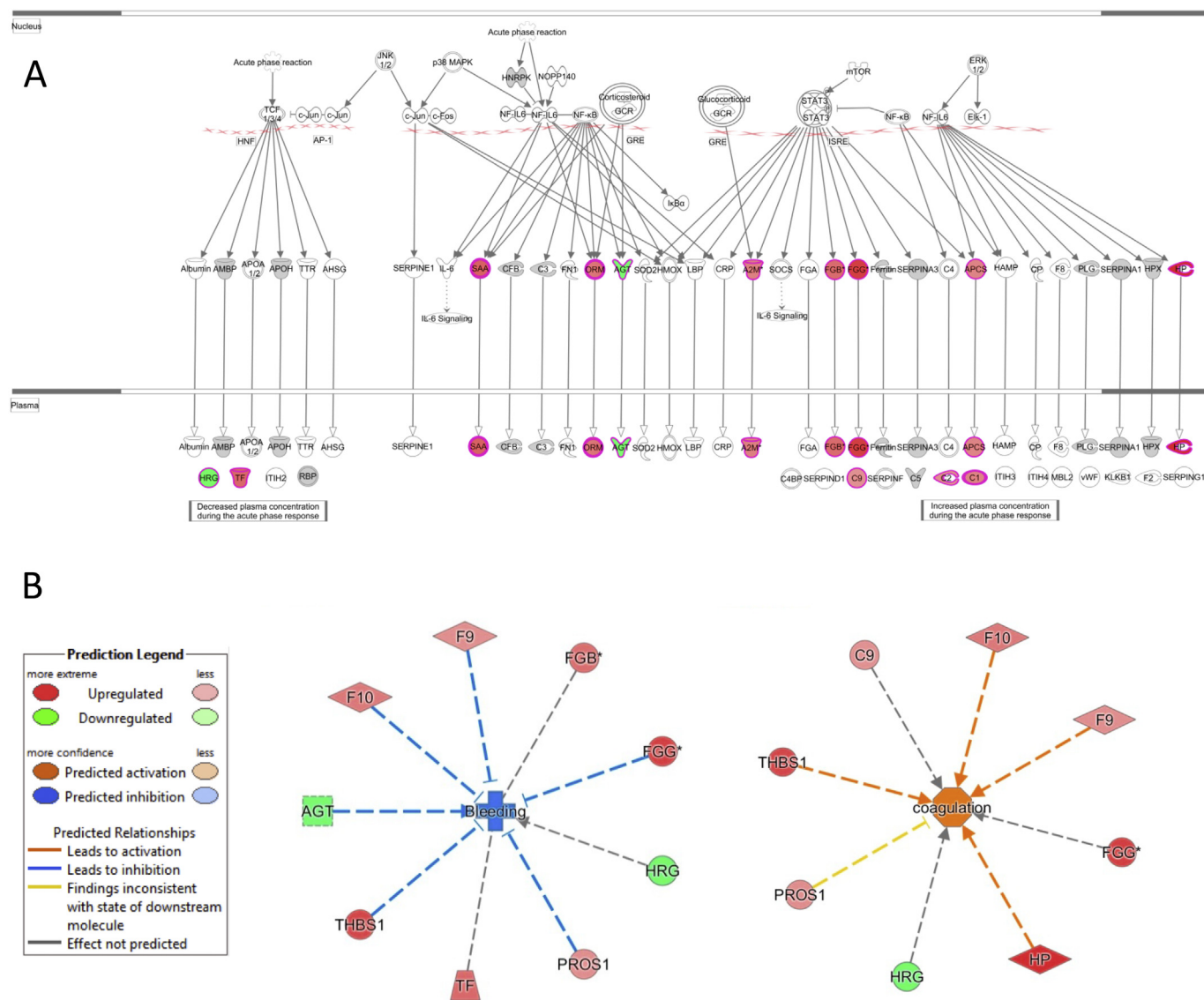


Fig. 2. Ingenuity Pathways Analysis representation of (A) Acute phase reaction signaling in fibromyalgia. Significant pathway nodes are shaded according to size of fold change (red > 1.2; green < 1.2), with white nodes indicating proteins that were not detected in the samples and grey indicating proteins that were detected, but not significantly. (B) Predicted state of coagulation and bleeding in fibromyalgia. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

moderate elevations of CRP and IL-6 that may even be masked by the influence of other factors. In fact, it has recently been demonstrated, in women with rheumatoid arthritis, that CRP levels are correlated with fat mass but not with disease activity, suggesting that CRP should be used cautiously in certain pathologies [27]. In line with those results, although Feinberg et al. [28] demonstrated a positive correlation between CRP and FM, the CRP values found in FM patients were nearly within the reference range and the addition of BMI weakened this relationship. Consequently, the heterogeneity in the findings from small case-control studies may reflect differing selection criteria among the controls. The exclusion criteria established in our study could explain the lack of correlation between CRP and FM. However, the modest influence of obesity on ESR [27] could account for our increased ESR values in FM patients, and would support its use as a more accurate disease activity biomarker.

During the inflammatory processes, complement and coagulation systems play crucial roles [29]. In fact, complement system has been associated to other rheumatic disorders such as Rheumatoid Arthritis [30] and SLE [25]. We found 6 proteins of the complement system

(C1S, CFAH, CO7, CO2, C1QC, CO9) overexpressed in FM patients. Except CFAH, an inhibitory protein of the alternative pathway, all these proteins are involved in the formation of the Membrane Attack Complex through the classical pathway. This pathway is mainly triggered by IgM/IgG-antigen complexes [31] and leads to chemotaxis and plasma protein exudation at inflammatory sites, facilitating the opsonization of damaged cells [21]. In accordance, our data showed increased levels of IgM, pointing out that the classical pathway of complement system is another factor to be considered in FM. Moreover, the high abundance of IgM could also contribute to the increased ESR values observed in our cohort of patients and previously reported in other inflammatory pathologies [24]. The complement cascade can also be activated by some coagulation proteins [29]. Our results showed higher levels of FIBB, FIBG, FA10, FA9, A2M and PROS, and a lower amount of ZPI, all of them involved in coagulation. Among these, FA10 and FA9 have been previously described as complement cascade activators. Therefore, these results could indicate the interplay of both pathways in FM. In fact, the extrinsic and the intrinsic prothrombin activation pathways showed the two highest ratios among the 25 statistically significant

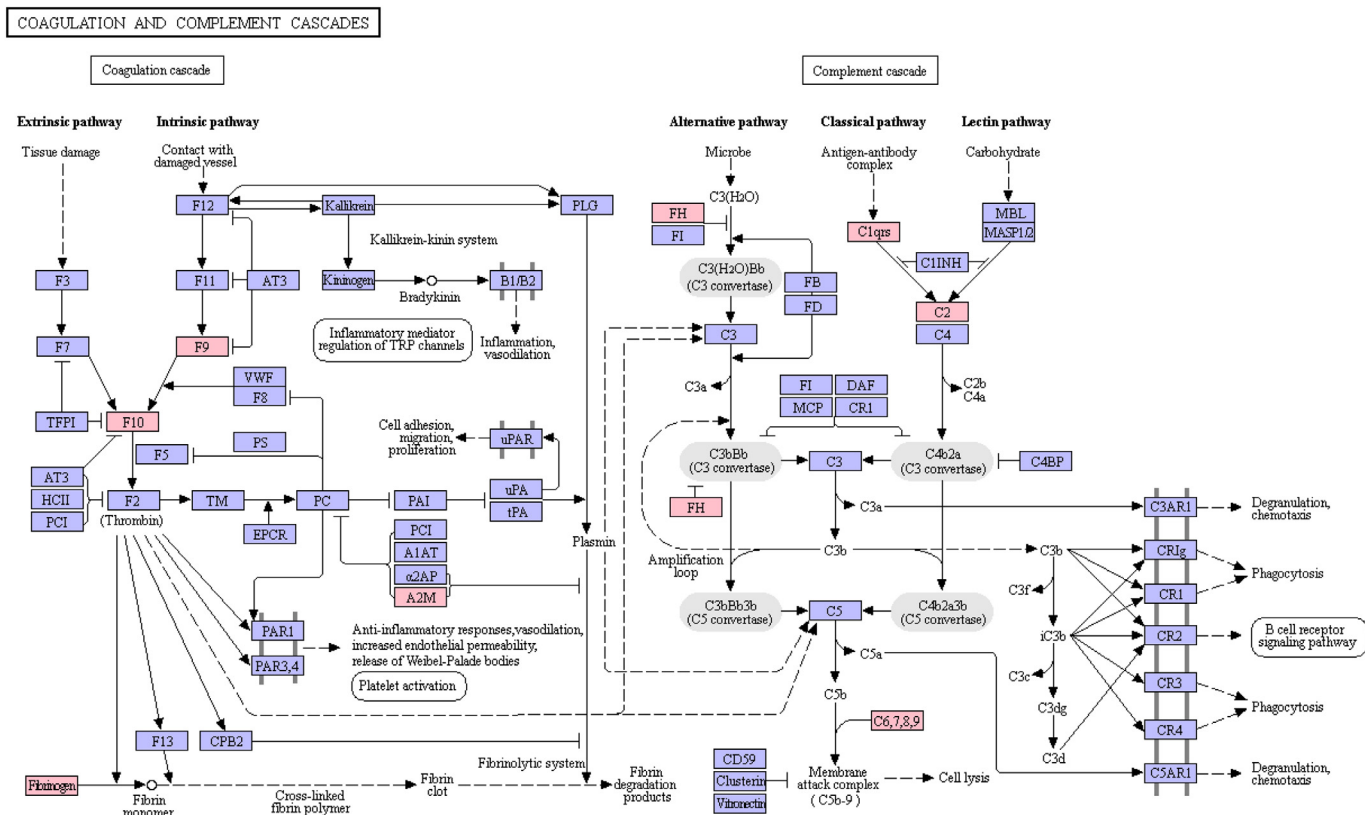


Fig. 3. KEGG representation of coagulation and complement cascades. Red coloured proteins are those with higher levels in patients with FM. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

enriched canonical pathways, emphasizing the crucial role of coagulation in the FM condition. The scarce literature in this field explains the pro-coagulant state in terms of platelet activation [32]. However, Berg et al. [33] described an increased level of fibrinogen in chronic fatigue syndrome and/or FM, which not always associates with platelet activation. In our study, the quantitative determination of fibrinogen by a standard analytical method confirmed the higher levels of fibrinogen observed by proteomics in patients with FM.

The proteomic analysis also identified significantly enriched the LXR/RXR activation pathway (APOL1, TRFE, A1AG1, A1AG2, CO9, CD14, APOC2, SAA4 and ANG1), predicted as activated with a z-score of 2.33, and the FXR/RXR pathway (APOL1, TRFE, A1AG1, A1AG2, CO9, FETUB, APOC2, SAA4 and ANG1). The RXR is a nuclear hormone receptor of the retinoid receptor family and the common partner for several others nuclear receptors such as LXR and FXR [34]. These receptors are known to be involved in many biological and pathological pathways associated with lipid metabolism and inflammation [35]. Particularly, LXR once bound to oxysterols activates sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c), a central lipogenic transcription factor [36, 37]. This activation results in the upregulation of different genes involved in lipogenesis and lipoprotein metabolism such as the apolipoprotein C-I/C-IV/C-II gene cluster [38], increased in our cohort of FM patients. Besides, LXR also activates reverse cholesterol transport in macrophages preventing foam cell formation and inhibits different pro-inflammatory transcription factors. Similarly, FXR activation regulates triacylglyceride metabolism, cholesterol homeostasis, and suppresses inflammatory pathways [35]. The anti-inflammatory activity of both pathways suggests that the activation of LXR and FXR pathways could attempt to alleviate the inflammatory environment mentioned above in FM patients. Glucocorticoids also exert a modulatory effect on inflammation and, in our study, CBG was found to be downregulated in FM patients, according to other authors [39]. CBG transports the 90% of the total cortisol in blood and is cleaved by

leukocyte elastase at sites of inflammation, inducing a typical S-to-R transition that results in hormone release [40]. Although there is no consensus about the effect of FM on cortisol levels [41–43] our group, among others, has not found differences in total cortisol level in this pathology [9, 44]. In this context, the CBG downregulation in our cohort could involve a higher bioavailability of free cortisol. Nevertheless, it is plausible that this cortisol may be unable to exert its modulatory effect on inflammation due to abnormalities in glucocorticoid receptor. In fact, therapeutic interventions with glucocorticoids have resulted ineffective in FM [45].

Neuroinflammatory mechanisms underlie physical and psychological distress [46], typical symptoms of FM condition. Consequently, the activation of acute phase response described in our proteomic study could be related to the statistically significant differences in the PCS-12 and MCS-12 results observed between FM patients and controls. Moreover, inflammation and stress physiology are reportedly associated to a high production of oxygen/nitrogen reactive species particularly in macrophages, and one of the pathways with a highest z-score found in our IPA analysis was precisely the production of nitric oxide and reactive oxygen species in macrophages. In this sense, our group has already described that patients with FM exhibit an imbalance between oxidants and antioxidants that results in higher oxidative DNA damage [9]. Haptoglobin is an acute phase reactant with antioxidant activity through its capability to bind hemoglobin and prevent the toxicity of heme iron. Consequently, its increase in chronic processes aims to counteract excessive oxidative stress preventing, among others, muscle atrophy [47]. Moreover, its higher levels in patients with FM were confirmed by conventional analytical methods. Plasma haptoglobin concentrations are known to be positively related to vegetative symptoms of depression, such as psychomotor retardation, energy, fatigue, hyperalgesia, and loss of interest or insomnia [48]. In a recent study, haptoglobin was also increased in plasma from women with chronic widespread pain [49] suggesting the existence of a low-grade systemic

Table 4
Correlations between inflammatory clinical data and proteomics.

		Clinical data			Proteomic data		
		Haptoglobin (mg/dl)	Fibrinogen (g/l)	ESR (mm)	HPT	FIBB	FIBG
Clinical data	Haptoglobin (mg/dl)	1	0.648**	0.667**	0.755***	0.506*	0.548**
	Fibrinogen (g/l)		1	0.791***	0.720***	0.568*	0.582*
	ESR (mm)			1	0.729***	0.484*	0.504*
Proteomic data	HPT				1	0.668***	0.670***
	FIBB					1	0.932***
	FIBG						1

* $p < 0.05$.** $p < 0.01$.*** $p < 0.001$.

References

- G.T. Jones, F. Atzeni, M. Beasley, E. Fließ, P. Sarzi-Puttini, G.J. Macfarlane, The prevalence of fibromyalgia in the general population: a comparison of the American College of Rheumatology 1990, 2010, and modified 2010 classification criteria, *Arthritis Rheum.* 67 (2015) 568–575.
- R.A. Hawkins, Fibromyalgia: a clinical update, *J. Am. Osteopath Assoc.* 113 (9) (2013) 680–689.
- L.M. Arnold, J.I. Hudson, E.V. Hess, A.E. Ware, D.A. Fritz, M.B. Auchenbach, et al., Family study of fibromyalgia, *Arthritis Rheum.* 50 (2004) 944–952.
- T.L. Pyke, P.G. Osmotherly, S. Baines, Measuring glutamate levels in the brains of fibromyalgia patients and a potential role for glutamate in the pathophysiology of fibromyalgia symptoms: a systematic review, *Clin. J. Pain* 33 (2017) 944–953.
- G.F. Romano, S. Tomassi, A. Russell, V. Mondelli, C.M. Pariante, Fibromyalgia and chronic fatigue: the underlying biology and related theoretical issues, *Adv. Psychosom. Med.* 34 (2015) 61–77.
- A.J. Cleare, The HPA axis and the genesis of chronic fatigue syndrome, *Trends Endocrinol. Metab.* 15 (2004) 55–59.
- S. Chinn, W. Caldwell, K. Gritsenko, Fibromyalgia pathogenesis and treatment options update, *Curr. Pain Headache Rep.* 20 (2016) 25.
- A. Rus, F. Molina, M. Gassó, M.V. Camacho, M.A. Peinado, M.L. Del Moral, Nitric oxide, inflammation, lipid profile and cortisol in normal and overweight women with fibromyalgia, *Biol. Res. Nurs.* 18 (2016) 138–146.
- M. La Rubia, A. Rus, F. Molina, Del moral M.L. Is fibromyalgia-related oxidative stress implicated in the decline of physical and mental health status? *Clin. Exp. Rheumatol.* 31 (2013) S121–S127.
- L. Bazzichi, F. Ciregia, L. Giusti, C. Baldini, G. Giannaccini, C. Giacomelli, et al., Detection of potential markers of primary fibromyalgia syndrome in human saliva, *Proteomics Clin. Appl.* 3 (2009) 1296–1304.
- C. Giacomelli, L. Bazzichi, L. Giusti, F. Ciregia, C. Baldini, Y. Da Valle, et al., MALDI-TOF and SELDI-TOF analysis: "tandem" techniques to identify potential biomarker in fibromyalgia, *Reumatismo* 63 (2011) 165–170.
- V. Ruggiero, B. Era, E. Cacace, L. Molin, M. Corda, A. Fais, et al., A preliminary study on serum proteomics in fibromyalgia syndrome, *Clin. Chem. Lab. Med.* 52 (2014) e207–e210.
- P. Olausson, B. Ghafouri, N. Ghafouri, B. Gerdle, Specific proteins of the trapezius muscle correlate with pain intensity and sensitivity - an explorative multivariate proteomic study of the trapezius muscle in women with chronic widespread pain, *J. Pain Res.* 9 (2016) 345–356.
- F. Wolfe, H.A. Smythe, M.B. Yunus, R.M. Bennett, C. Bombardier, D.L. Goldenberg, et al., The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia: report of the multicenter criteria committee, *Arthritis Rheum.* 33 (1990) 160–172.
- G. Vilagut, M. Ferrer, L. Rajmil, P. Rebollo, G. Permanyer-Miralda, J.M. Quintana, et al., The Spanish version of the short form 36 health survey: a decade of experience and new developments, *Gac. Sanit.* 19 (2005) 135–150.
- J.R. Wiśniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, M. Mann, Universal sample preparation method for proteome analysis, *Nat. Methods* 6 (2009) 359–362.
- F. Ceciliani, A. Giordano, V. Spagnolo, The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins, *Protein Pept. Lett.* 9 (2002) 221–223.
- P.C. Heinrich, T.A. Castell, T. Andus, Interleukin-6 and the acute phase response, *Biochem. J.* 265 (1990) 621–636.
- A.S. Van Miert, Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects, *Vet Q* 17 (1995) 41–50.
- P.C. Heinrich, I. Behrmann, G. Müller-Newmen, F. Schaper, L. Graeve, Interleukin-6 type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochem. J.* 334 (1998) 297–314.
- C. Gabay, I. Kushner, Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 448–454.
- A. Baralla, A.G. Fois, E. Sotgiu, E. Zinellu, A.A. Mangoni, S. Sotgiu, et al., Plasma proteomic signatures in early chronic obstructive pulmonary disease, *Proteomics Clin. Appl.* (2018), <https://doi.org/10.1002/prca.201700088>.
- L. Bazzichi, A. Rossi, G. Massimetti, G. Giannaccini, T. Giuliano, F. De Feo, et al., Cytokine patterns in fibromyalgia and their correlation with clinical manifestations, *Clin. Exp. Rheumatol.* 25 (2007) 225–230.
- A. Wiik, M. Fritzler, Laboratory tests in rheumatic disorders, in: M. Hohenberg, A. Silman, J. Smolen, M. Winblatt, M. Weisman (Eds.), *Rheumatology*. Philadelphia (PA), Elsevier, 2008, pp. 219–232.
- D.J. Wallace, S.L. Silverman, J. Conklin, D. Barken, Systemic lupus erythematosus and primary fibromyalgia can be distinguished by testing for cell-bound complement activation products, *Lupus Sci. Med.* 3 (2016).
- M.A. Kashipaz, D. Swinden, I. Todd, R. Powell, Normal production of inflammatory cytokines in chronic fatigue and fibromyalgia syndromes determined by intracellular cytokine staining in short-term cultured blood mononuclear cells, *Clin. Exp. Immunol.* 132 (2003) 360–365.
- M.D. George, J.T. Giles, P.P. Katz, B.R. England, T.R. Mikuls, K. Michaud, et al., Impact of obesity and adiposity on inflammatory markers in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Care Res.* 69 (2017) 1789–1798.
- T. Feinberg, U. Sambamoorthi, C. Lilly, K.K. Innes, Potential mediators between fibromyalgia and C-reactive protein: results from a large U.S. community survey, *BMC Musculoskelet. Disord.* 18 (2017) 294.
- K. Oikonomopoulou, D. Ricklin, P.A. Ward, J.D. Lambris, Interactions between coagulation and complement-their role in inflammation, *Semin. Immunopathol.* 34 (2012) 151–165.
- M. Okroj, D. Heinegård, R. Holmdahl, A.M. Blom, Rheumatoid arthritis and the complement system, *Ann. Med.* 39 (2007) 517–530.
- D. Ricklin, G. Hajishengallis, K. Yang, J.D. Lambris, Complement - a key system for immune surveillance and homeostasis, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 785–797.
- M. Milovanovic, S. Nilsson, P.I. Haakara, C. Post, B. Gerdle, High in vivo platelet activity in female fibromyalgia patients, *J. Biomed. Sci.* 5 (2016) 3.
- D. Berg, L.H. Berg, J. Couvaras, H. Harrison, Chronic fatigue syndrome and/or fibromyalgia as a variation of antiphospholipid antibody syndrome: an explanatory model and approach to laboratory diagnosis, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 10 (1999) 435–438.
- T.H. Bugge, J. Pohl, O. Ionnoy, H.G. Stunnenberg, RXR alpha: a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors, *EMBO J.* 11 (1992) 1406–1418.
- J.A. van Diepen, J.F. Berbée, L.M. Havekes, P.C. Rensen, Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis, *Atherosclerosis* 228 (2013) 306–315.
- J.R. Schultz, H. Tu, A. Luk, J. Repa, J.C. Medina, L. Lil, et al., Role of LXRs in control of lipogenesis, *Genes Dev.* 14 (2000) 2831–2838.
- T. Yoshikawa, H. Shimano, M. Amemiya-Kudo, N. Yahagi, A.H. Hasty, T. Matsuzaka, et al., Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the steryl regulatory element-binding protein 1 c promoter, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 2991–3000.
- P.A. Mark, B.A. Laffitte, C. Desrumaux, S.B. Joseph, L.K. Curtiss, D.J. Mangelsdorf, et al., Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 31900–31908.
- E.G. Lentjes, E.N. Griep, J.W. Boersma, F.P. Romijn, E.R. de Kloet, Glucocorticoid receptors, fibromyalgia and low back pain, *Psychoneuroendocrinology* 22 (1997) 603–614.
- J.G. Lewis, C.J. Bagley, P.A. Elder, A.W. Bachmann, D.J. Torpy, Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 359 (2005) 189–194.
- A. Gur, R. Cevik, A.J. Sarac, L. Colpan, S. Em, Hypothalamic-pituitary-gonadal axis and cortisol in young women with primary fibromyalgia: the potential roles of depression, fatigue, and sleep disturbance in the occurrence of hypocortisolism, *Ann. Rheum. Dis.* 63 (2004) 1504–1506.
- L.J. Crofford, E.A. Young, N.C. Engleberg, A. Korszun, C.B. Brucksch, L.A. McClure, et al., Basal circadian and pulsatile ACTH and cortisol secretion in patients with fibromyalgia and/or chronic fatigue syndrome, *Brain Behav. Immun.* 18 (2004) 314–325.
- M.E. Bote, J.J. García, M.D. Hinchado, E. Ortega, Inflammatory/stress feedback dysregulation in women with fibromyalgia, *Neuroimmunomodulation* 19 (2012) 343–351.
- R.P. Freitas, T.M. Lemos, M.H. Spyrides, M.B. Sousa, Influence of cortisol and DHEA-S on pain and other symptoms in postmenopausal women with fibromyalgia, *J. Back Musculoskelet. Rehabil.* 25 (2012) 245–252.
- G. Littlejohn, Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional

- pain syndrome, *Nat. Rev. Rheumatol.* 11 (2015) 639–648.
- [46] A.H. Miller, C.L. Raison, The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target, *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2016) 22–34.
- [47] E. Bertaggia, G. Scabia, S. Dalise, F. Lo Verso, F. Santini, P. Vitti, et al., Haptoglobin is required to prevent oxidative stress and muscle atrophy, *PLoS ONE* 9 (2014).
- [48] M. Maes, S. Scharpé, H.Y. Meltzer, P. Cosyns, Relationships between increased haptoglobin plasma levels and activation of cell-mediated immunity in depression, *Biol. Psychiatry* 34 (1993) 690–701.
- [49] K. Wåhlén, P. Olausson, A. Carlsson, N. Ghafouri, B. Gerdle, B. Ghafouri, Systemic alterations in plasma proteins from women with chronic widespread pain compared to healthy controls: a proteomic study, *J. Pain Res.* 10 (2017) 797–809.

