

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MÉTODOS LC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ESFINGOLÍPIDOS CON APLICACIÓN EN PÁRKINSON-GBA

Memoria de tesis doctoral presentada por

Laura Castillo Ribelles

para optar al grado de doctor

Dirigida por

Dra. Clara Carnicer Cáceres

Dra. Marta Martínez Vicente

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina
Universitat Autònoma de Barcelona
Barcelona, 2025

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis directoras de tesis, las Dras. Clara Carnicer y Marta Martínez. Sois mis referentes, todo lo que he aprendido de vosotras tiene un valor incalculable, tanto en el plano científico como en el humano. Gracias por la oportunidad, la confianza y por acompañarme en cada paso de este camino.

A Toño, por tu experiencia y consejos, que han sido una guía constante para mí, incluso años antes de que este proyecto se iniciara formalmente. Gracias también por la oportunidad.

A la Dra. Roser Ferrer y al Dr. Francisco Rodríguez, por la confianza depositada en mí durante estos años, por apoyarme en mi crecimiento profesional y personal.

Al equipo técnico de Metabolopatías (Marc, Carmen, Neus, Jordi y M. Antonia), por vuestra ayuda y cercanía en las jornadas de poyata.

Al equipo de Neurodegenerativas del VHIR, por brindarme la oportunidad de trabajar con vosotros.

A todos los adjuntos, residentes y técnicos de laboratorio del servicio de Bioquímica del Hospital Vall d'Hebron, que me han acompañado en estos años. Con especial cariño a mis R pequeños y R mayores, por vuestra compañía y apoyo. A Noe, gracias por tu ayuda y tu cariño.

A mamá y papá, Alberto, abuelos, por vuestro cariño. A Victor, por tu apoyo incondicional y paciencia infinita. A Maia y Max, por estar siempre cerca de mí.

A todas aquellas personas —amigas, compañeras y familiares— que han estado presentes durante estos años.

Resumen

Las variantes en *GBA1*, gen que codifica la β -glucocerebrosidasa lisosomal (β -GCasa), constituyen el factor de riesgo genético más frecuente para la enfermedad de Parkinson (EP), definiendo una entidad clínica y biológica particular (EP-GBA). La reducción de la actividad β -GCasa favorece la acumulación de sus sustratos esfingolipídicos, como las glucosilceramidas (GluCer) y derivados como la glucosilesfingosina (GluSph), junto con alteraciones en la homeostasis lipídica, lisosomal y del retículo endoplasmático, el tráfico vesicular, las vías de autofagia y la función mitocondrial. Estos procesos promueven la acumulación de α -sinucleína y la formación de agregados insolubles, generando un entorno de estrés celular que contribuye a la neurodegeneración.

La caracterización bioquímica de estas alteraciones es fundamental para profundizar en los mecanismos de la enfermedad y avanzar en el desarrollo de biomarcadores que permitan la estratificación clínica y la monitorización de terapias, en línea con estrategias de medicina personalizada. Sin embargo, la elevada variabilidad de resultados entre estudios limita la comparación de grupos y la interpretación de los datos, debido en gran parte a la falta de armonización y robustez en los métodos *in-house* empleados.

Esta tesis se centra en el desarrollo, evaluación y aplicación de métodos basados en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS) para cuantificar esfingolípidos en distintas matrices como potenciales biomarcadores. Se optimizaron métodos basados en cromatografía de fase reversa para cuantificar hexosilceramida (HexCer) y hexosilesfingosina (HexSph) en pellets celulares, suero y tejidos murinos, permitiendo caracterizar alteraciones consistentes con la literatura y monitorizar la eficacia de terapias experimentales. Además, se desarrolló y evaluó un método basado en cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) para cuantificar isoformas de GluCer y galactosilceramida (GalCer) en líquido cefalorraquídeo (LCR) humano. Su aplicación en la cohorte *Vall d'Hebron Initiative for Parkinson* (VHIP) reveló tendencias en las ratios GluCer/GalCer más elevadas en pacientes con EP-GBA respecto a controles, más pronunciadas en portadores de variantes severas en *GBA1*.

La falta de recomendaciones armonizadas entre guías internacionales dificulta la evaluación de parámetros que impactan en la precisión, veracidad y sensibilidad de los métodos LC-MS/MS, como el efecto matriz. La complejidad estructural de los esfingolípidos, la presencia de múltiples analitos endógenos y las matrices biológicas complejas o de disponibilidad limitada aumentan este desafío. Para abordarlo, esta tesis propone un flujo de trabajo sistemático que integra múltiples estrategias, acompañado de una herramienta que automatiza los cálculos, facilitando la evaluación integral del efecto matriz, y favoreciendo la adherencia a las recomendaciones de las guías internacionales.

En conjunto, el trabajo establece un marco experimental y analítico que conecta hallazgos preclínicos y clínicos, aporta herramientas transferibles para la validación de métodos y respalda el uso de glicoesfingolípidos (GSL) como biomarcadores en EP-GBA.

Índice

Lista de abreviaturas	13
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. LA ENFERMEDAD DE PÁRKINSON	17
1.2. EL LISOSOMA EN LA ENFERMEDAD DE PÁRKINSON	22
1.2.1. La vía autofagia-lisosoma: función en la homeostasis celular	22
1.2.2. Disfunción de la autofagia en Párkinson	23
1.2.3. El vínculo con las enfermedades de depósito lisosomal	26
1.2.4. Función fisiológica de <i>GBA1</i> en el metabolismo de los glicoesfingolípidos (GSL) e implicación en la enfermedad de Gaucher	27
1.2.5. <i>GBA1</i> como factor de riesgo de Párkinson	34
1.2.6. Mecanismos subyacentes de la enfermedad de Párkinson asociada a <i>GBA1</i>	38
1.2.7. Terapias modificadoras de la enfermedad dirigidas a <i>GBA1</i>	41
1.3. ESTUDIO DE GLUCOSILCERAMIDA Y GLUCOSILESFINGOSINA EN LA ENFERMEDAD DE PÁRKINSON ASOCIADA A <i>GBA1</i>	43
1.3.1. La importancia de la búsqueda de nuevos biomarcadores	43
1.3.2. El estudio de la actividad β -GCasa	44
1.3.3. Características del sustrato de β -GCasa y otros GSL relacionados	44
1.3.4. Cuantificación de GluCer (o HexCer) y GluSph (o HexSph) en diferentes matrices.....	47
1.4. PARTICULARIDADES DEL DESARROLLO DE MÉTODOS <i>IN-HOUSE</i> LC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACION DE GSL	52
1.4.1. Optimización del parámetros del detector MS	53
1.4.2. Optimización del pretratamiento	57
1.4.3. Optimización de la cromatografía	58
1.5. EVALUACIÓN ANALÍTICA DE MÉTODOS <i>IN-HOUSE</i> BASADOS EN LC-MS/MS	60
1.5.1. Revisión de las recomendaciones de las guías internacionales	60
1.5.2. Evaluación del efecto matriz, la eficiencia de la recuperación y la eficiencia del proceso	61
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71

3. MATERIALES Y MÉTODOS	75
3.1. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	77
3.1.1. Estándares y reactivos	77
3.1.2. Equipamiento	78
3.1.3. Preparación de las soluciones stock de estándares e IS	78
3.1.4. Preparación de soluciones intermedias	78
3.1.5. Optimización de los métodos	78
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS SECCIÓN I: RELATIVOS A LOS MÉTODOS LC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GSL EN MODELOS PRECLÍNICOS	80
3.2.1. Obtención de las muestras de modelos preclínicos	80
3.2.1.1. <i>Muestras de pellets celulares</i>	80
3.2.1.2. <i>Muestras de tejido y suero de ratón</i>	80
3.2.2. Cuantificación de HexCer y HexSph en pellets celulares y muestras de tejido de modelo de ratón	80
3.2.2.1. <i>Cuantificación de proteínas</i>	80
3.2.2.2. <i>Preparación de las soluciones WS(STD)_{CT-RP} y WS(IS)_{CT-RP}</i>	81
3.2.2.3. <i>Preparación de la curva de calibración y los controles de calidad internos</i>	81
3.2.2.4. <i>Monitorización analítica</i>	81
3.2.3. Cuantificación de HexSph en suero de ratón	82
3.2.3.1. <i>Preparación de soluciones WS(STD)_{SUE-RP} y WS(IS)_{SUE-RP}</i>	82
3.2.3.2. <i>Preparación de la curva de calibración y los controles de calidad internos</i>	83
3.2.3.3. <i>Pretratamiento</i>	83
3.2.3.4. <i>Condiciones LC-MS/MS</i>	83
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS SECCIÓN II: RELATIVOS AL MÉTODO LC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DE GLUCER Y GALCER EN LCR HUMANO	84
3.3.1. Muestras humanas y ética	84
3.3.2. Preparación de las soluciones WS(STD) _{LCR-HIL} y WS(IS) _{LCR-HIL}	84
3.3.3. Preparación de la curva de calibración y los controles de calidad internos	86
3.3.4. Evaluación analítica del método	86
3.3.4.1. <i>Linealidad</i>	86
3.3.4.2. <i>Límite de blanco, límite de detección y límite de cuantificación</i>	86
3.3.4.3. <i>Precisión y veracidad</i>	87
3.3.4.4. <i>Selectividad</i>	87
3.3.4.5. <i>Estabilidad de los analitos en la muestra</i>	87
3.3.4.6. <i>Arrastre</i>	88
3.3.5. Efecto matriz, eficiencia de recuperación y eficiencia del proceso	88
3.3.5.1. <i>Preparación de las soluciones de trabajo</i>	88
3.3.5.2. <i>Preparación de los sets de muestras</i>	89
3.3.5.3. <i>Cálculos aplicados para su evaluación</i>	92
3.3.5.4. <i>Herramienta Excel</i>	93
3.3.5.5. <i>Criterios de aceptación</i>	93
3.3.6. Cuantificación de isoformas de GluCer y GalCer en LCR humano	93
3.3.7. Estadística	94

RESULTADOS SECCIÓN I

4. MÉTODOS LC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GSL EN MODELOS PRECLÍNICOS

.....	97
4.1. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HEXCER Y HEXSPH EN PELLET CELULAR Y TEJIDO MURINO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA	99
4.1.1. Optimización del protocolo de pretratamiento para pellets celulares	99
4.1.2. Optimización del protocolo de pretratamiento para tejido de ratón	99
4.1.3. Optimización de los parámetros del detector MS y de las condiciones cromatográficas en fase reversa	101
4.1.4. Curva de calibración y controles de calidad internos	104
4.1.5. Normalización de los resultados	105
4.1.6. Monitorización analítica	105
4.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS HILIC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCER Y GALCER EN TEJIDO CEREBRAL DE RATÓN	108
4.3. APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS LC-MS/MS CON CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA EN MODELOS PRECLÍNICOS	113
4.3.1. Caracterización de un modelo celular con déficit de β -GCasa	113
4.3.2. Caracterización de un modelo murino con déficit de β -GCasa	114
4.3.3. Evaluación de chaperonas alostéricas para <i>GBA1</i>	115
4.3.4. Evaluación de nanoconjugados para terapia de reemplazo enzimático	118

RESULTADOS SECCIÓN II

5. MÉTODO LC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DE GLUCER Y GALCER EN LCR HUMANO

.....	123
5.1. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCER Y GALCER EN LCR HUMANO	125
5.1.1. Pretratamiento de las muestras de LCR	125
5.1.2. Optimización de los parámetros cromatográficos y del detector	125
5.1.3. Curva de calibración y controles de calidad internos	127
5.2. EVALUACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCER Y GALCER EN LCR HUMANO	129
5.2.1. Separación cromatográfica	129
5.2.2. Linealidad de la curva	129
5.2.3. Límite de blanco, límite de detección y límite de cuantificación	132
5.2.4. Precisión y veracidad	132
5.2.5. Selectividad	132
5.2.6. Estabilidad	136
5.2.7. Arrastre	137

6. INTEGRACIÓN DE ESTRATEGIAS PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ	139
6.1. RESULTADOS TEÓRICOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	141
6.1.1. Primera estrategia	141
6.1.2. Segunda estrategia	143
6.1.3. Tercera estrategia	143
6.1.4. Herramienta Excel	144
6.2. APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DEL MÉTODO CLÍNICO	146
6.2.1. Primera estrategia	146
6.2.2. Segunda estrategia	148
6.2.3. Tercera estrategia	148
7. APLICACIÓN DEL MÉTODO EN UNA COHORTE CLÍNICA	153
7.1. CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE CLÍNICA	155
7.2. RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCER Y GALCER EN LCR HUMANO	156
8. DISCUSIÓN	163
8.1. MÉTODOS PRECLÍNICOS COMO PRUEBA DE CONCEPTO	165
8.1.1. Principales consideraciones en su desarrollo	165
8.1.1.1. <i>Curva de calibración</i>	165
8.1.1.2. <i>Monitorización analítica: controles de calidad internos y factores de normalización</i>	167
8.1.2. Resultados obtenidos en su aplicación preclínica	168
8.2. IMPACTO DE LA VARIABILIDAD EXTRA-ANALÍTICA Y ANALÍTICA EN ESTUDIOS CLÍNICOS	170
8.2.1. Variables extra-analíticas	172
8.2.2. Variables analíticas	172
8.3. EVALUACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DE GLUCER Y GALCER EN LCR	175
8.3.1. Separación cromatográfica	176
8.3.2. Linealidad y curva de calibración	176
8.3.3. Límite de blanco, límite de detección y límite de cuantificación	177
8.3.4. Precisión y veracidad	177
8.3.5. Selectividad	177
8.4. ESTUDIO INTEGRAL DEL EFECTO MATRIZ	179
8.4.1. Primera estrategia	179
8.4.1.1. <i>Variación de las áreas absolutas. Impacto en la eficiencia de ionización y recuperación en la precisión del método</i>	179

8.4.1.2. <i>Variación de las áreas ratio y las pendientes, y compensación del IS</i>	179
8.4.2. Segunda estrategia	182
8.4.3. Tercera estrategia	183
8.4.3.1. <i>Impacto del efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso en el rendimiento del método: implicaciones en su desarrollo</i>	183
8.4.3.2. <i>Impacto del efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso: capacidad compensatoria del IS</i>	185
8.4.3.3. <i>Variabilidad del efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso</i>	186
8.5. HERRAMIENTAS TRANSFERIBLES PARA LA EVALUACIÓN DE MÉTODOS	188
8.5.1. La evaluación de métodos en el marco regulatorio actual	188
8.5.2. Integración en una herramienta de trabajo para la evaluación del efecto matriz ...	188
8.6. INTERPRETACIÓN Y SIGNIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS GSL	192
8.6.1. Perfil clínico y lipídico en la cohorte EP-GBA	192
8.6.2. Relación entre biomarcadores lipídicos y progresión clínica	194
8.6.3. Consideraciones para la aplicabilidad clínica	194
8.7. LIMITACIONES DE LA TESIS	196
8.7.1. Limitaciones relacionadas con el desarrollo de los métodos	196
8.7.2. Limitaciones relacionadas con la evaluación del método para la cuantificación de isoformas en LCR	197
8.7.3. Limitaciones relacionadas con la aplicación clínica en la cohorte VHIP	198
8.8. PERSPECTIVAS FUTURAS	199
8.8.1. Medicina personalizada	199
8.8.2. Estandarización y armonización de metodologías EP-GBA	201
9. CONCLUSIONES	203
10. REFERENCIAS	207
11. ANEXO	229
11.1. PUBLICACIONES EN EL MARCO DE LA TESIS	231
11.2. COMUNICACIONES EN EL MARCO DE LA TESIS	232

Lista de abreviaturas

ALP	Vía autofagia-lisosoma
CHCl ₃	Cloroformo
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CS	Control sano
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CV	Coeficiente de variación
DBS	Sangre en gota seca
EG	Enfermedad de Gaucher
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EP	Enfermedad de Párkinson
EP-GBA	Enfermedad de Párkinson asociada a variantes GBA
EPI	Enfermedad de Párkinson idiopática
ERT	Terapia de Reemplazo Enzimático
ESI	Ionización por Electrospray
FA	Ácido Fórmico
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FM	Fase móvil
GalCer	Galactosilceramida
GalSph	Galactosilesfingosina
Gcasa	Glucocerebrosidasa
GSL	Glicoesfingolípido
GluCer	Glucosilceramida
GluSph	Glucosilesfingosina
HexCer	Hexosilceramida
HexSph	Hexosilesfingosina
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica
HQC	Control de calidad a concentración alta
H&Y	Hoehn y Yahr
IPA	Isopropanol
IVDR	Regulación de Diagnóstico In Vitro
IS	Estándar interno
KI	<i>Knock In</i>
KO	<i>knock Out</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDT	Tests desarrollados por el laboratorio
LLE	Extracción líquido-líquido
LLLI	Límite inferior del intervalo de linealidad
LLMI	Límite inferior del intervalo de medida (=LoQ)

LLQC	Control de calidad al límite inferior de cuantificación
LQC	Control de calidad a concentración baja
LSD	Enfermedad por depósito lisosomal
LSI	Iniciativa de Estandarización en Lipidómica
LoB	Límite de Blanco
LoD	Límite de Detección
LoQ	Límite de Cuantificación (=LLMI)
LysoGb3	Globotriosilesfingosina
LysoSM	Esfingosilfosforilcolina o lisoefingomielina
MDS	Sociedad de Trastornos de Movimiento
MDS-UPDRS	Escala Unificada para Valoración de EP de la MDS
ME	Efecto matriz
rME	Efecto matriz relativo (variación entre lotes)
MEF	Factor efecto matriz (ratio estándar/IS)
rMEF	Factor efecto matriz relativo (variación entre lotes)
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MoCA	Evaluación Cognitiva de Montreal
MQC	Control de calidad a concentración media
MRM	Monitoreo de Reacciones Múltiples
PE	Eficiencia del proceso
rPE	Eficiencia del proceso relativa (variación entre lotes)
PEF	Factor eficiencia del proceso (ratio estándar/IS)
rPEF	Factor eficiencia del proceso relativo (variación entre lotes)
QC	Control de calidad
RE	Eficiencia de recuperación
rRE	Eficiencia de recuperación relativa (variación entre lotes)
REF	Factor de recuperación (ratio estándar/IS)
rREF	Factor de recuperación relativo (variación entre lotes)
RP-LC	Cromatografía en fase reversa
SM	Esfingomielina
SNC	Sistema Nervioso Central
SPE	Extracción en fase sólida
SRT	Terapia de Reducción de Sustrato
STD	Estándar
TR	Tiempo de Retención
ULOQ	Límite superior de cuantificación (=ULMI)
VHIP	<i>Vall d'Hebron Initiative for Parkinson</i>
VHIR	Instituto de Investigación Vall d'Hebron
VMC	Mesencéfalo ventral
WS	Solución de Trabajo
WT	<i>Wild Type</i>

1

Introducción

1.1. LA ENFERMEDAD DE PÁRKINSON

La enfermedad de Párkinson (EP) es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente, después de la enfermedad de Alzheimer, y el trastorno del movimiento más común. Afecta al 1% de la población mayor de 60 años, y presenta una tasa de prevalencia global de entre 100 y 200 casos por cada 100.000 individuos [1,2].

Los síntomas motores característicos de la EP incluyen bradicinesia, temblor en reposo, rigidez, y alteraciones en la postura y la marcha. Aunque se clasifica como un trastorno del movimiento, casi todos los pacientes presentan síntomas no motores, como hiposmia, estreñimiento, disfunción urinaria, hipotensión ortostática, pérdida de memoria, depresión, dolor y trastornos del sueño. Los signos motores se asocian con degeneración nigroestriatal, mientras que los no motores implican neurodegeneración en otras áreas. Los síntomas no motores suelen preceder a los motores; sin embargo, su inespecificidad dificulta el diagnóstico temprano, resultando en un retraso promedio de hasta 10 años [3] y una tasa de error diagnóstica del 15-24% [4]. Además, la principal dificultad reside en diferenciar la EP de trastornos parkinsonianos atípicos, como la demencia con cuerpos de Lewy, la atrofia multisistémica y las taupatías, así como de causas secundarias, incluyendo efectos farmacológicos, exposición a toxinas, enfermedad cerebrovascular o hidrocefalia normotensiva [5].

El sello neuropatológico de la EP incluye la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra y la presencia de cuerpos de Lewy formados principalmente por la proteína α -sinucleína agregada, lo que clasifica esta enfermedad como una sinucleinopatía. La α -sinucleína, una proteína soluble de 14 kDa codificada por el gen *SNCA*, desempeña un papel clave en la regulación de la actividad y la dinámica de las vesículas sinápticas, localizándose predominantemente en terminales presinápticos [6]. En condiciones fisiológicas, la concentración de α -sinucleína está regulada por un equilibrio entre su síntesis y degradación. Sin embargo, alteraciones en estos mecanismos pueden provocar un aumento de la concentración de la proteína, facilitando la formación de agregados, como monómeros desnaturalizados, oligómeros, protofibrillas y fibrillas maduras de tipo amiloide [6,7]. Los cuerpos de Lewy observados en las neuronas y células gliales están compuestos principalmente por la α -sinucleína

fibrilada, junto con ubiquitina y p62; además, también pueden incluir otras proteínas mal plegadas, lípidos, o incluso estructuras membranosas [8]. La agregación aberrante de α -sinucleína se considera central en la patogénesis de la EP, aunque otros procesos, como la disfunción mitocondrial y lisosomal, la neuroinflamación y la eliminación anormal de proteínas, también contribuyen a la progresión de la enfermedad. En conjunto, estos mecanismos desencadenan la toxicidad y muerte acelerada de neuronas dopaminérgicas [3].

El diagnóstico clínico de la EP actualmente se basa en la historia clínica, la exploración neurológica y la respuesta al tratamiento dopaminérgico. Según los criterios de la Sociedad Internacional de Parkinson y Trastornos del Movimiento (MDS), el diagnóstico con un nivel de certeza “clínicamente establecida” de EP requiere la detección de parkinsonismo, definido por la presencia de bradicinesia asociada a temblor en reposo, rigidez, o ambos; la ausencia de criterios de exclusión; la presencia de al menos dos criterios de soporte, que refuerzan el diagnóstico; y la ausencia de señales de alarma (o *red flags*), que reducen la probabilidad diagnóstica. Por otro lado, el nivel de certeza “clínicamente probable” de EP se establece cuando se cumplen los dos primeros requisitos, pero hay presencia de una o dos *red flags*, las cuales pueden compensarse con al menos uno o dos criterios de soporte, respectivamente. El primer nivel prioriza la especificidad, mientras que el segundo maximiza la sensibilidad [9]. El diagnóstico definitivo sólo es posible *post mortem*, basado en la degeneración de la sustancia nigra por la presencia de patología por cuerpos de Lewy [5].

La EP es un trastorno multifactorial, donde la mayoría de los casos son idiopáticos, y se relacionan con interacciones genético-ambientales, siendo la edad el principal factor de riesgo [4,10]. Aproximadamente el 15% de los casos son familiares, y entre un 5-10 % corresponden a formas monogénicas. Hasta la fecha, se han identificado más de 20 loci (PARK) asociados a EP con herencia mendeliana. Entre ellos, *SNCA*, *LRRK2* y *VPS35* presentan herencia autosómica dominante; los genes autosómicos recesivos *PRKN*, *PINK1* y *DJ-1* se asocian a un fenotipo similar al de la EP idiopática, mientras que *ATP13A2*, *PLA2G6*, *FBXO7*, *DNAJC6* y *VPS13C* a formas clínicas atípicas [11]. Las primeras mutaciones asociadas a la EP fueron las de herencia autosómica dominante en el gen *SNCA* (PARK1). Las mutaciones en *LRRK2* (PARK8) son la causa más frecuente de EP

monogénica autosómica dominante, mientras que las mutaciones en *Parkin* (PARK2/PRKN) representan hasta el 50% de los casos familiares autosómico recesivos de inicio temprano [5,7]. Además, se han identificado más de 90 variantes independientes asociadas al riesgo de desarrollar EP idiopática; algunas de ellas corresponden a genes implicados en las formas mendelianas, como *LRRK2* y *SNCA* [11], lo que subraya la complejidad genética de la EP. El estudio de las variantes genéticas implicadas mejora la comprensión de las bases moleculares de la EP y facilita el desarrollo de tratamientos modificadores de la enfermedad. En este contexto, durante las últimas décadas se ha establecido una sólida relación entre la EP y la vía autofagia-lisosoma (ALP), subrayando su papel en la fisiopatología de la enfermedad [7,12–16] (Tabla 1).

Tabla 1. Genes asociados con formas monogénicas de la enfermedad de Parkinson.

HGNC (MIM)	Locus	Proteína	Función biológica principal	Herencia	Fenotipo clínico (MIM)	Frecuencia
<i>SNCA</i> (163890)	PARK1, PARK4	α -sinucleína	Proteína presináptica que regula el tráfico de vesículas sinápticas y la exocitosis de neurotransmisores	AD	Clásico / Inicio temprano Progresión rápida. Demencia (168601)	Rara
<i>LRRK2</i> ‡ (609007)	PARK8	Dardarina, treonina- protein quinasa rica en repeticiones de leucina	GTPasa que regula el tráfico vesicular, autofagia, inflamación y plasticidad neuronal	AD	Clásico (607060)	Común
<i>RAB32</i> ‡ (612906)	PARK26	Rab 32, asociada a Ras	GTPasa que regula el tráfico de membranas intracelulares, desde la formación de vesículas hasta su fusión	AD	Clásico (620923)	Rara
<i>VPS35</i> ‡ (601501)	PARK17	Proteína asociada a la clasificación vacuolar 35	Parte del complejo retromero, asegura la clasificación correcta para el reciclaje de las proteínas en el lisosoma	AD	Clásico (614203)	Muy rara
<i>UCHL1</i> *‡ (191342)	PARK5	Hidrolasa de ubiquitina C-terminal tipo L1	Desubiquitinasa; mantiene la reserva de monoubiquitina para las vías ubiquitina-proteasoma y autofagia-lisosoma; mantenimiento de la función sináptica.	AD	Clásico (613643)	-

(Cont.)

Tabla 1 (Cont.). Genes asociados con formas monogénicas de la enfermedad de Parkinson.

HGNC (MIM)	Locus	Proteína	Función biológica	Herencia	Fenotipo clínico (MIM)	Frecuencia
<i>GIGYF2</i> * (612003)	PARK11	Proteína GYF interactuante con GRB10	Componente clave del complejo multiproteico 4EHP-GYF2, que actúa como represor del inicio de la traducción	AD	Clásico (607688)	-
<i>EIF4G1</i> * (600495)	PARK18	Factor de inicio de la traducción eucariota 4 gamma 1	Componente del complejo proteico eIF4F, implicado en el reconocimiento del ARNm	AD	Clásico (614251)	-
<i>DNAJC13</i> * (614334)	PARK21	Proteína tipo DnaJ, subfamilia C, homólogo 13	Participa en el tráfico de membranas a través de endosomas	AD	Clásico (616361)	-
<i>TMEM230</i> * (617019)		Proteína transmembrana 230	Implicada en el tráfico y reciclaje de vesículas sinápticas	AD	Clásico. Relacionado con PARK21.	-
<i>CHCHD2</i> * (616244)	PARK22	Proteína con dominios CHCH (<i>coiled-coil-helix-coiled-coil-helix</i>)	Factor de transcripción mitocondrial dependiente de condiciones de oxígeno	AD	Clásico (616710)	Rara
<i>PRKN</i> ‡ (602544)	PARK2	Parkina (ligasa de ubiquitina tipo E3)	Unión covalente de ubiquitina, promueve la mitofagia	AR	Inicio temprano Progresión lenta (600116)	Rara / 1º más común de inicio temprano
<i>PINK1</i> ‡ (608309)	PARK6	Kinasa de serina/treonina inducida por PTEN	Sensor de daño mitocondrial y protector frente a la disfunción mitocondrial; activa la mitofagia	AR	Inicio temprano Progresión lenta (605909)	Rara / 2º más común de inicio temprano
<i>DJ1</i> (602533)	PARK7	Deglicasa	Protector celular, sensor de estrés oxidativo y chaperona y proteasa sensible al redox; repara proteínas glicadas	AR	Inicio temprano Progresión lenta (606324)	Rara
<i>DNAJC6</i> ‡ (608375)	PARK19	Auxilina	Co-chaperona implicada en endocitosis mediada por clatrina de vesículas sinápticas, reciclaje y tráfico intracelular	AR	Inicio temprano Progresión lenta (615528)	Rara
<i>VPS13C</i> ‡ (608879)	PARK23	Proteína homóloga C de clasificación vacuolar 13	Transferencia de lípidos entre membranas; participa en la regulación de la mitofagia mediada por PINK1/PRKN	AR	Inicio temprano Progresión rápida (616840)	Rara

(Cont.)

Tabla 1 (Cont.). Genes asociados con formas monogénicas de la enfermedad de Parkinson.

HGNC (MIM)	Locus	Proteína	Función biológica	Herencia	Fenotipo clínico (MIM)	Frecuencia
<i>ATP13A2</i> ‡ (610513)	PARK9	ATPasa tipo 13A2	Transportador lisosomal de cationes/poliaminas; homeostasis lisosomal y mitocondrial; homeostasis catiónica y mantenimiento de la integridad neuronal; regula la vía autofagia-lisosoma	AR	Inicio temprano Atípico (Kufor-Rakeb). Demencia (606693)	Muy rara
<i>PLA2G6</i> (603604)	PARK14	Fosfolipasa A2 del grupo VI	Metabolismo de fosfolípidos neuronales; homeostasis de la membrana celular, integridad mitocondrial y transducción de señales	AR	Inicio temprano Atípico (612953)	Rara
<i>FBX07</i> ‡ (605648)	PARK15	Proteína F-box 7	Parte del complejo ubiquitina ligasa; regula la proteostasis y la mitofagia	AR	Inicio temprano Atípico (260300)	Muy rara
<i>SYNJ1</i> ‡ (604297)	PARK20	Synaptojanina 1 (fosfatasa de fosfoinosítidos)	Participa en la endocitosis mediada por clatrina	AR	Atípico (615530)	Muy rara
<i>HTRA2</i> * (606441)	PARK13	Proteasa de serina HtrA2 mitocondrial	Promueve la apoptosis, función neuroprotectora	AR	Clásico (610297)	-

PARK3, PARK10, PARK12, PARK16, y PARK22 se excluyen de la tabla porque se consideran factores de riesgo [5].

* Su implicación no se ha confirmado de forma concluyente; ‡ Función asociada al sistema autofagia-lisosomal (ALP). HGNC: HUGO gene nomenclature committee; OMIM: base de datos Online de Herencia Mendeliana en el Hombre, AD: autosómico dominante, MU: multifactorial, AR: autosómico recesivo, LX: Ligado al X. Adaptada de Tolosa et al. [4], Blauwendraat et al. [17], Salles et al. [11], Morris et al. [18] y UniProt [19].

1.2. EL LISOSOMA EN LA ENFERMEDAD DE PÁRKINSON

1.2.1. La vía autofagia-lisosoma: función en la homeostasis celular.

Las vías por las que se degradan la mayoría de las proteínas citosólicas y mal plegadas son el sistema ubiquitina-proteasoma y la ALP. El primero es necesario para la eliminación de la mayoría de las proteínas citosólicas de vida media corta y de las proteínas mal plegadas, e implica la unión covalente de moléculas de ubiquitina, seguida de su degradación por el proteasoma. Por su parte, la ALP incluye una red coordinada de rutas autofágicas que convergen en el lisosoma, donde se eliminan proteínas más estables, de vida media larga, y orgánulos completos. En función del mecanismo por el cual los sustratos son internalizados en el lumen lisosomal, se definen la macroautofagia, la autofagia mediada por chaperonas (CMA) y la microautofagia [13,20,21] (Figura 1).

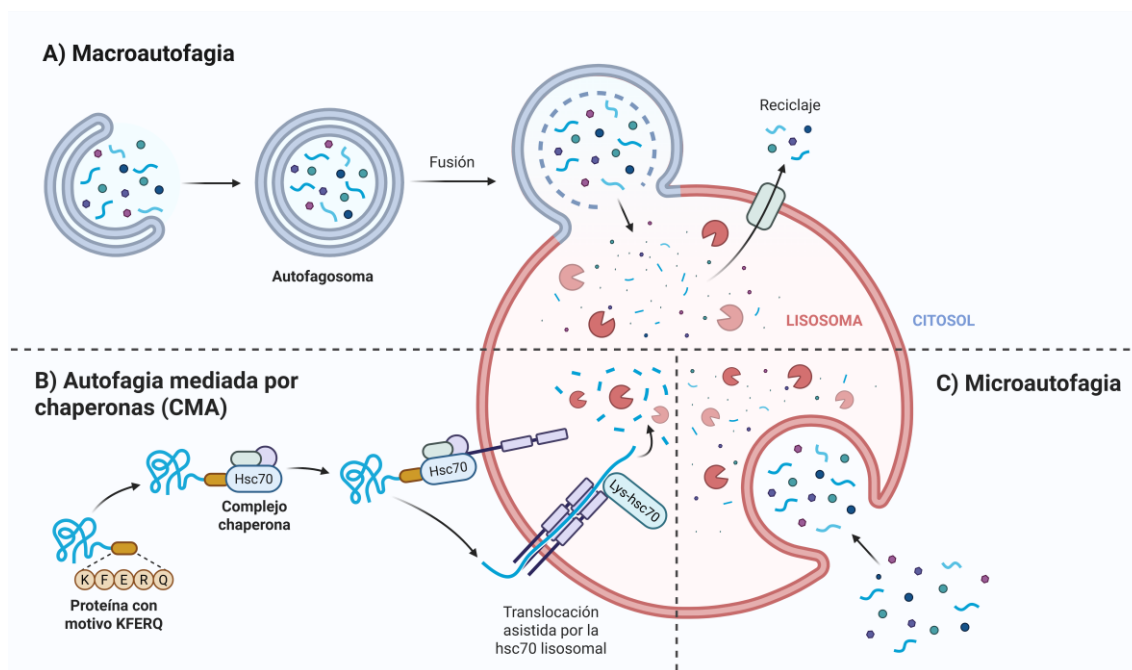


Figura 1. Representación gráfica de los tres tipos de autofagia. A) Macroautofagia, **B)** Autofagia mediada por chaperonas (CMA), **C)** Microautofagia. Creada con <https://BioRender.com>.

La macroautofagia es el principal mecanismo responsable de la degradación de los componentes intracelulares para mantener la homeostasis celular y un equilibrio adecuado entre la síntesis y la degradación de proteínas.

Por otro lado, la CMA es una forma altamente selectiva de autofagia que facilita la degradación de proteínas citosólicas específicas que portan el motivo KFERQ-*like*, reconocido por la chaperona hsc70. La traslocación del sustrato junto con la chaperona al lumen lisosomal es mediada por el complejo multimérico LAMP-2A, una proteína de membrana asociada al lisosoma [12,20], cuyos niveles en la membrana regulan la actividad CMA.

Finalmente, la microautofagia se encarga de la degradación de regiones completas del citoplasma, incluidas proteínas y orgánulos, mediante la invaginación directa de la membrana lisosomal.

La eliminación de proteínas mal plegadas, agregados y el recambio de orgánulos son procesos esenciales para garantizar la homeostasis celular. Debido a su morfología, alta demanda metabólica y estado postmitótico, las neuronas son particularmente vulnerables a la alteración de estos sistemas de degradación. Esta susceptibilidad favorece la acumulación patológica de proteínas, un proceso central en la patogénesis de numerosas enfermedades neurodegenerativas, como ocurre con la agregación de α -sinucleína en la EP.

1.2.2. Disfunción de la autofagia en Párkinson.

La concentración intracelular de α -sinucleína se mantiene por un equilibrio entre su síntesis y degradación (Figura 2). Un desequilibrio en cualquiera de estos procesos conduce a un aumento en su concentración citoplasmática, favoreciendo la formación de especies oligoméricas y fibrilares, que resultan tóxicas para las neuronas y promueven la neurodegeneración. Entre las causas de este desequilibrio se incluyen la sobreexpresión del gen *SNCA*, causada por duplicaciones génicas o variaciones en la región promotora que afectan su síntesis, así como mutaciones puntuales, modificaciones postraduccionales y disfunción de los sistemas de recambio celular, que comprometen su degradación [6,7].

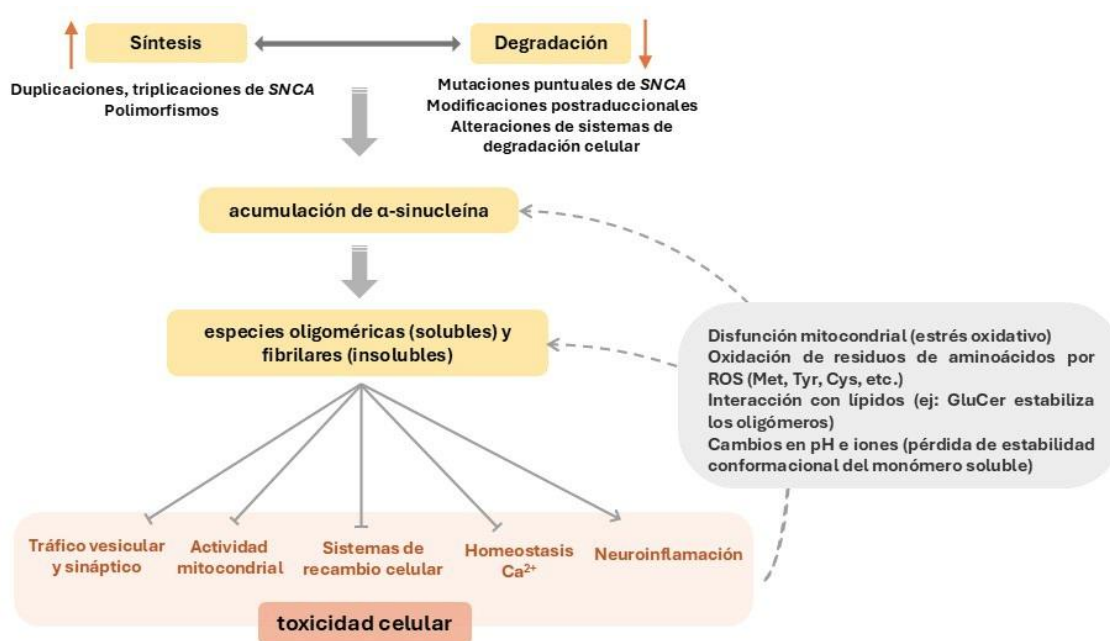


Figura 2. Mecanismos implicados en la acumulación y agregación de α -sinucleína y su contribución a la toxicidad celular en la enfermedad de Parkinson.

La α -sinucleína monomérica se degrada por ambos sistemas, aunque predominantemente por la ALP. La selección de la vía depende de factores como la localización celular, las modificaciones postraduccionales y el estado oligomérico de la proteína. Las formas solubles se eliminan preferentemente mediante CMA, mientras que las especies agregadas sólo lo hacen por macroautofagia, ya que constituye la única vía degradativa intracelular capaz de eliminar agregados proteicos [16,22,23]. Por ello, algunos estudios concluyen que la inhibición de la función del proteasoma no resulta en una acumulación anormal de α -sinucleína, a diferencia de la inhibición de la CMA o de la macroautofagia, que sí conllevan un incremento de sus formas patogénicas [24,25].

En este contexto, durante las últimas décadas se ha establecido una asociación entre la disfunción lisosomal y la EP, por la implicación de muchos de los genes causales y factores de riesgo de la enfermedad en funciones clave de la ALP [7,24,26] (Tabla 1). Por ejemplo, la alteración de la proteína LRRK2 (*LRRK2/PARK8*), la causa genética más conocida de EP familiar, afecta a múltiples procesos celulares, incluyendo endocitosis, inflamación, apoptosis y autofagia [27]. Una de las variantes más frecuentes, p.G2019S, impide su propia degradación por la vía CMA y compromete, además, la eliminación de

otros sustratos como la α -sinucleína [28]. Las mutaciones por pérdida de función en genes como *PRKN/PARK2* y *PINK1/PARK6*, involucrados en la vía de mitofagia dependiente de PINK1-Parkin, pueden provocar defectos en la degradación selectiva de mitocondrias dañadas [7,20,29]. La función de la proteína UCHL1 (*UCHL1/PARK5*) no se asocia directamente con CMA pero, al interactuar con LAMP2A para ser degradada por esta vía, su forma mutante bloquea la maquinaria, de forma similar a lo descrito para LRRK2 [7,21,30]. Las mutaciones en *ATP13A2* (*ATP13A2/PARK9*), gen que codifica una bomba ATPasa lisosomal, están asociadas a disfunción lisosomal y al síndrome parkinsoniano atípico Kufor-Rakeb [31,32]. Un número significativo de otros genes asociados a EP, incluyendo *GBA1*, *TMEM175*, *VPS35*, *ATP6AP2*, *RAB7L1*, *VPS13C*, *DNAJC13*, *DNAJC6*, y *CTSD* participan en el sistema ALP [7] (Figura 3). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la disfunción de la ALP es un mecanismo central en la patogénesis de la EP.

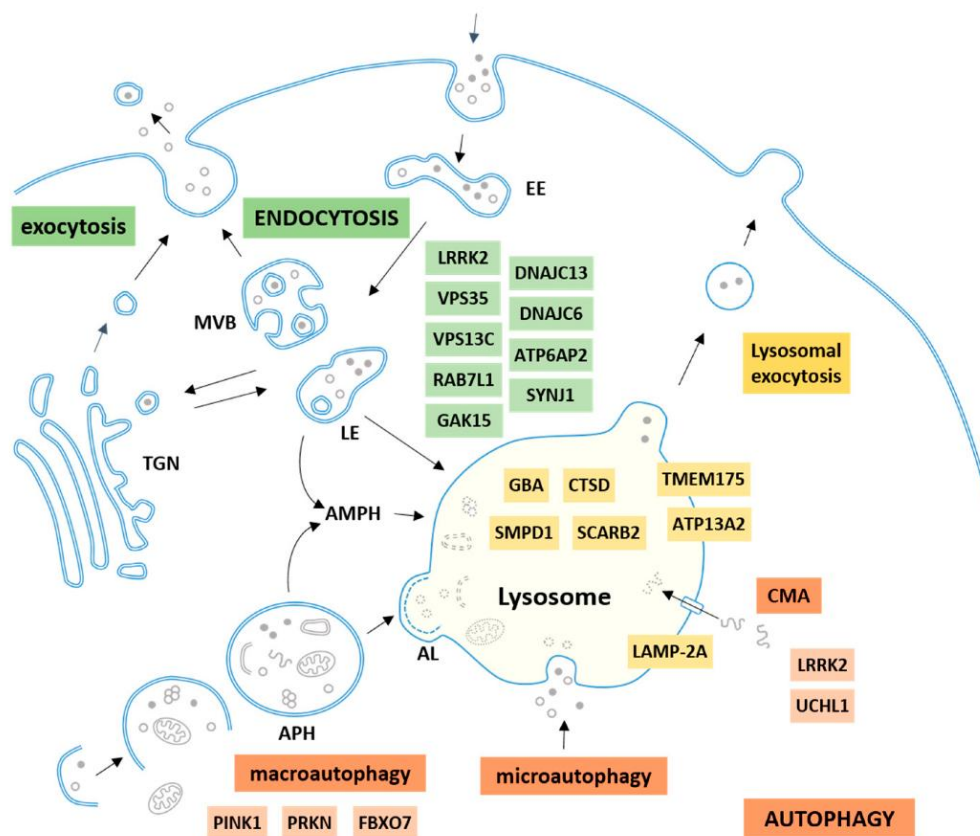


Figura 3. El sistema autofagia lisosoma y las proteínas relacionadas con enfermedad de Parkinson. Reproducción autorizada de Navarro-Romero et al.[7].

1.2.3. El vínculo con las enfermedades de depósito lisosomal.

La relación entre la disfunción lisosomal y la patogénesis de la EP se evidencia en las enfermedades de depósito lisosomal (*lysosomal storage diseases*, LSD). Este grupo heterogéneo engloba aproximadamente 70 enfermedades metabólicas hereditarias causadas por mutaciones en genes que codifican proteínas lisosomales, principalmente hidrolasas con actividad disminuida o ausente, aunque también otras no enzimáticas relacionadas con la función lisosomal, como proteínas de membrana [33]. El defecto primario conlleva a un patrón bioquímico común caracterizado por acumulación de sustratos no degradados. Las consecuencias dependen del tipo de sustrato, su localización celular y extensión, y su impacto sobre otros procesos celulares, lo que explica su heterogeneidad fenotípica, en cuanto a edad de inicio, gravedad y grado de afectación del sistema nervioso central (SNC). No obstante, muchas se presentan en pediatría con afectación neurológica acompañadas de visceromegalia.

A nivel fisiopatológico, la acumulación de sustratos desencadena alteraciones secundarias comunes que contribuyen a la patogénesis de las LSD, como la disfunción mitocondrial, la neuroinflamación, la desregulación de vías de señalización, y la disfunción autofágica-lisosomal, con la consiguiente acumulación de proteínas alteradas y otros sustratos secundarios no relacionados con la proteína defectuosa (Figura 4). La supresión específica de la autofagia en el SNC provoca la acumulación de proteínas anómalas, disfunción celular general y neurodegeneración [21]. Por ello, la neurodegeneración constituye una de las manifestaciones principales en las LSD y, a su vez, estas alteraciones secundarias de las LSD reflejan mecanismos compartidos implicados en enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, la EP, la demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Huntington, entre otras [34,35].

Asimismo, se ha reportado una mayor prevalencia de variantes en genes asociados a LSDs en pacientes con EP, con hasta un 56% de los individuos portando al menos una variante patogénica en estos genes [36]. Las mutaciones en los genes *GLA* y *SMPD1*, asociados a la enfermedad de Fabry y a la enfermedad de Niemann-Pick A/B, respectivamente, están relacionadas con un mayor riesgo de desarrollar EP. Además, se ha descrito sinucleinopatía en el cerebro de pacientes y modelos animales en la

leucodistrofia metacromática, enfermedad de Sandhoff, Sanfilippo, Niemann-Pick, Tay-Sachs, y Krabbe, entre otras [7,15,37].

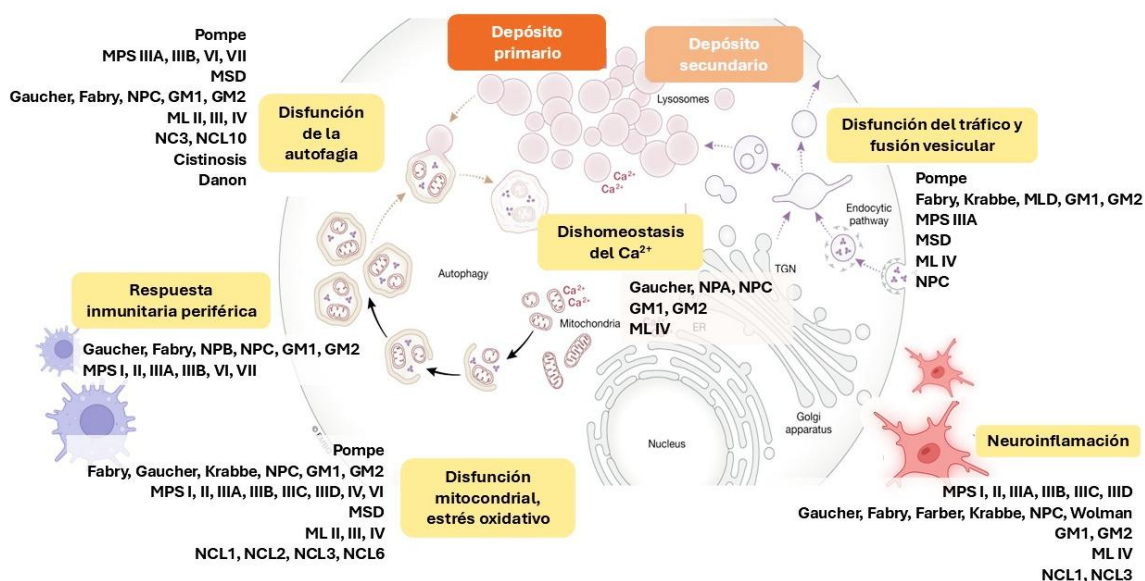


Figura 4. Mecanismos implicados en la fisiopatología de las enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSD). Las vías moleculares secundarias implicadas en las diferentes LSD presentan características comunes con la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson. *MPS: mucopolisacaridosis, NP: Niemann-Pick, MLD: leucodistrofia metacromática, MSD: deficiencia múltiple de sulfatasa, ML: mucopolipidosis, NC: lipofuscinosis neuronal cerioidea, GM: gangliosidosis.* Adaptada de Parenti et al. [38].

La evidencia más significativa de esta relación se encuentra en el gen *GBA1*, cuyas variantes en homocigosis o heterocigosis son el principal factor de riesgo genético descrito para desarrollar EP (Tabla 2).

1.2.4. Función fisiológica de *GBA1* en el metabolismo de los glicoesfingolípidos (GSL) e implicación en la enfermedad de Gaucher.

Las mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en *GBA1* (EC 3.2.1.45) causan la enfermedad de Gaucher (EG), una glicoesfingolipidosis que se encuentra entre las LSD

Tabla 2. Principales genes implicados en enfermedades de depósito lisosomal (LSD) como factores de riesgo de EP.

Gen	Defecto primario	Función	LSD	Evidencia
Esfingolipidosis				
<i>GBA1</i>	Glucocerebrosidasa ácida lisosomal	Hidroliza la glucosilceramida lisosomal en ceramida y glucosa	Gaucher	+++
<i>SMPD1</i>	Esfingomielinasa	Hidroliza la esfingomielina en ceramida	Niemann-Pick tipo A/B	++
<i>GLA</i>	α -galactosidasa A	Hidroliza residuos terminales α -galactosil de galactolípidos y glicoproteínas	Fabry	+
<i>GALC</i>	Galactocerebrosidasa	Hidroliza enlaces éster de galactosa en glicolípidos como galactosilceramida y galactosilsfingosina	Krabbe	+
<i>ARSA</i>	Arilsulfatasa A	Hidroliza sulfato de cerebrósido en cerebrósido y sulfato	Leucodistrofia metacromática	+
<i>ASAHI</i>	Ceramidasa ácida	Hidroliza ceramidas en esfingosina y ácidos grasos libres	Farber	+
Lipofuscinosis neuronal ceroid				
<i>ATP13A2</i>	ATPasa tipo 13A2	Transportador lisosomal de cationes/poliaminas	Lipofuscinosis neuronal ceroid 12	+++
<i>CTSD</i>	Catepsina D	Proteasa ácida lisosomal	Lipofuscinosis neuronal ceroid 10	+
Trastornos por proteínas integrales de membrana				
<i>SCARB2</i>	LIMP-2 (proteína de membrana lisosomal 2)	Receptor lisosomal independiente de manosa-6-fosfato para β -GCasa	Síndrome mioclono-insuficiencia renal	++
<i>SLC17A5</i>	Sialina	Exportador lisosomal de ácido siálico libre	Salla	+
<i>NPC1</i>	NPC Transportador intracelular de colesterol 1	Tráfico intracelular de colesterol	Niemann-Pick tipo C	+
Mucopolisacaridosis				
<i>NAGLU</i>	α -N-acetil glucosaminidasa	Hidroliza residuos terminales de N-acetil- α -D-glucosamina en heparán sulfato	Mucopolisacaridosis tipo IIIB/ Sanfilippo B	+
<i>GUSB</i>	β -glucuronidasa	Hidroliza enlaces β -D-glucuronósido en GAGs como dermatán y queratán sulfato	Mucopolisacaridosis tipo VII / Sly	+
Glicoproteinosas				
<i>NEU1</i>	Sialidasa-1	Hidroliza residuos terminales de ácido siálico de glicoconjugados	Sialidosis	+

Adaptada de Navarro et al. [7], Platt et al. [33], y UniProt [19].

más prevalentes [33], con una incidencia de 1/50.000 nacimientos en la población general y de 1/800 en judíos asquenazíes [39].

Comprender la función de *GBA1* requiere situarla dentro del metabolismo lipídico lisosomal y, en particular, en el de los glicoesfingolípidos (GSL).

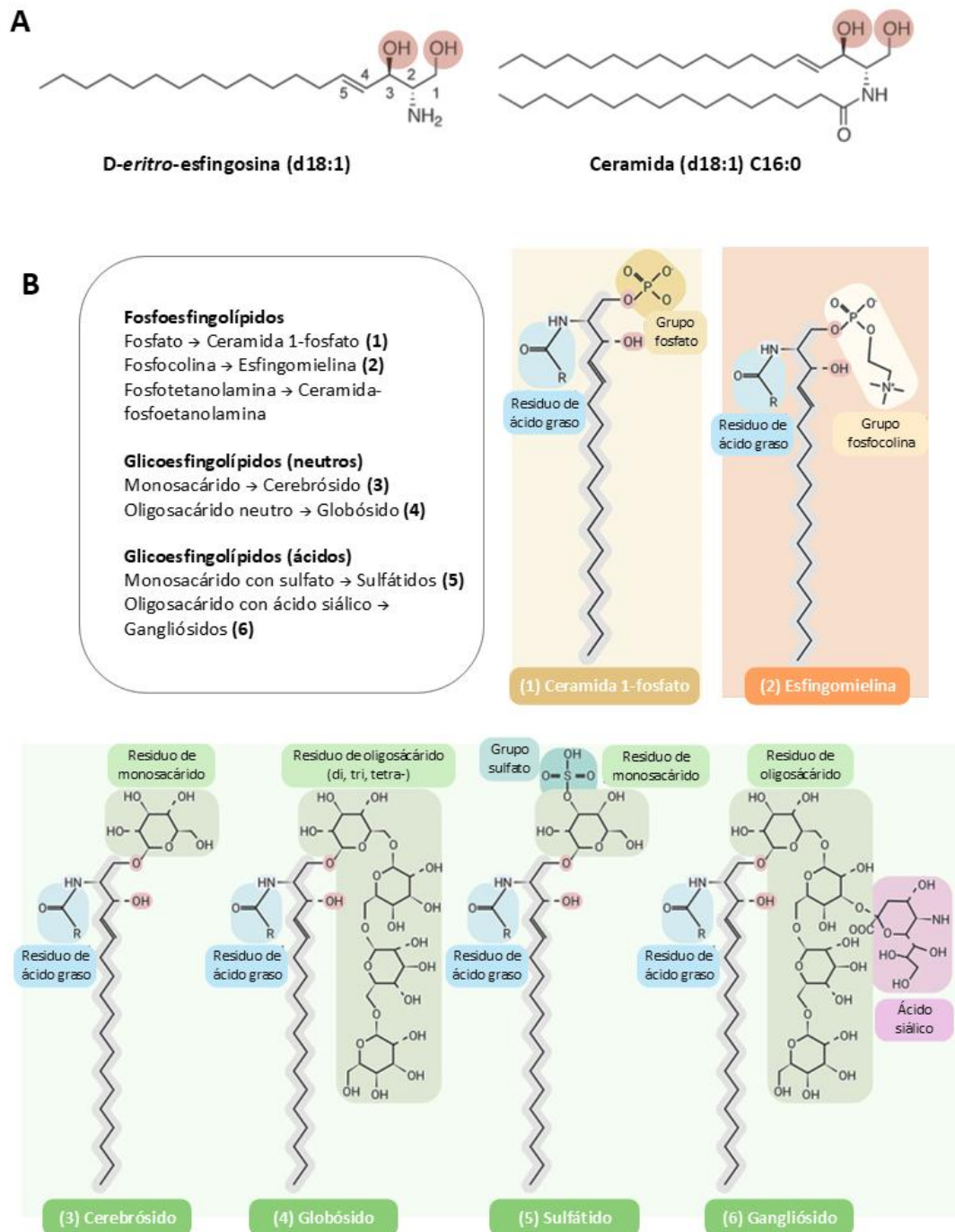


Figura 5. Estructura básica de los esfingolípidos. A) Estructura básica de esfingosina d18:1 (izquierda) y su unión amida a un ácido graso, palmitoil como ejemplo, formando la estructura de ceramida d18:1/C16:0 (derecha). B) Clasificación de esfingolípidos en función de grupo de cabeza. Adaptada de Companioni et al. [40] y Merrill [41].

Los esfingolípidos son lípidos anfipáticos que constan de un aminoalcohol alifático de base (esfingosina) cuyos átomos de carbono varían de 12 a 22, siendo en vertebrados la d-eritroesfingosina (18:1) la estructura predominante. La ceramida es la molécula

resultante de la acilación de la base en la posición 2-amino y la unión mediante un enlace amida a un ácido graso (Figura 5A).

El ácido graso incorporado presenta variaciones en longitud (C16-C24), saturaciones e hidroxilaciones, siendo el ácido esteárico (C18) el más abundante en mamíferos [42,43]. También hay pequeñas cantidades de lisoesfingolípidos, que carecen del sustituyente N-acil [41].

La unión covalente del grupo 1-hidroxilo de la ceramida a una fracción de fosfato (fosfocolina, fosfoetanolamina) o carbohidrato genera los fosfoesfingolípidos y los GSL, respectivamente (Figura 5B).

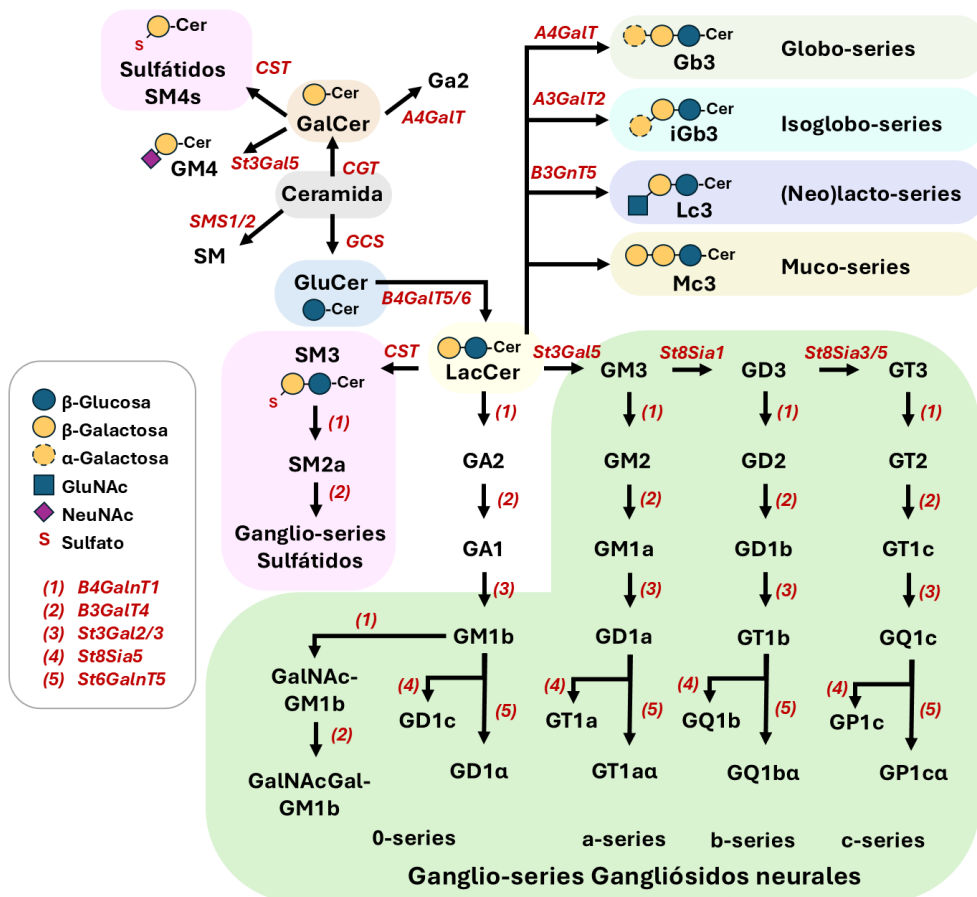


Figura 6. Rutas de biosíntesis de diferentes familias de esfingolípidos. La mayoría de las estructuras de GSL se basan en la unión inicial de glucosa a las ceramidas (GluCer), a partir de éste, la lactosilceramida (LacCer) constituye un punto de ramificación fundamental. Desde LacCer, la acción de diversas glicosiltransferasas y una sulfotransferasa conduce a la formación de las series de gangliósidos neuronales a, b y c, así como de otras series como globo-, isoglobo-, muco- y lacto-series. También se incluyen vías derivadas de GalCer hacia GM4 y sulfátidos. Adaptada de Sandhoff et al. [44], creada con <https://BioRender.com>.

Los GSL se originan a partir de ceramida que, mediante glucosilación en el aparato de Golgi o galactosilación en el retículo endoplasmático, da lugar a glucosilceramida (GluCer) o galactosilceramida (GalCer), respectivamente [45]. La heterogeneidad estructural de los GSL proviene no sólo de las isoformas de ácidos grasos y ceramidas, sino de la composición y secuencia de azúcares que se añaden al monosacárido inicial, describiéndose más de 400 estructuras de glicanos diferentes [46], y diversas familias de series estructurales como globo-, isoglobo-, lacto-, neolacto- y ganglio- [41,46] (Figura 6).

En cambio, la degradación de los GSL ocurre en los lisosomas, donde glicohidrolasas específicas eliminan los grupos glicano de forma secuencial. En este contexto, *GBA1* codifica la glucocerebrosidasa lisosomal (β -GCase), que cataliza la hidrólisis de GluCer en ceramida y glucosa, y constituye el penúltimo paso en la degradación de los GSL complejos [47–49].

Para ello, en condiciones fisiológicas (Figura 7) la enzima se ensambla en el retículo endoplasmático y se transporta al lisosoma unida al receptor de la proteína de membra-

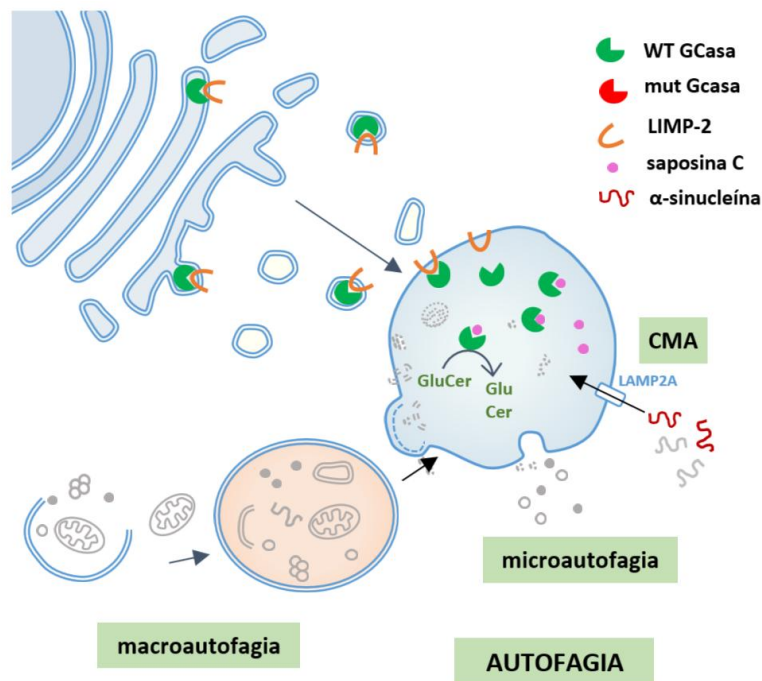


Figura 7. Actividad fisiológica de β -GCase en la vía autofagia-lisosoma. La β -GCase se sintetiza en el retículo endoplasmático, donde es reconocida por su transportador específico, LIMP-2. Ambos son transportados al lisosoma, donde el complejo β -GCase –LIMP-2 se disocia, permitiendo que la β -GCase interactúe con su coactivador, la saposina C. En el lisosoma, la β -GCase hidroliza la glucosilceramida (GluCer) en ceramida y glucosa. En condiciones fisiológicas, la vía principal para la degradación de la α -sinucleína soluble es la autofagia mediada por chaperonas (CMA). Adaptada de Pradas et al. [26].

na lisosomal (LIMP-2), en un proceso dependiente del pH; por ello, la unión β -GCasa – LIMP-2 es estable durante el tráfico a través del retículo y Golgi, pero se disocia al entrar en el ambiente ácido del lumen lisosomal [26]. La saposina C actúa como proteína activadora lisosomal de β -GCasa [48,49].

Además de la β -GCasa lisosomal, otras dos glucosidasas citosólicas comparten una actividad enzimática similar y llevan a cabo la degradación de GluCer, pero no presentan homología estructural ni de secuencia [50]. *GBA2* (EC3.2.1.45) codifica para una enzima no lisosomal localizada en la superficie citosólica del retículo endoplasmático y/o del aparato de Golgi [50], mientras que *GBA3* (EC3.2.1.21) codifica una enzima citosólica relacionada con Klotho que se encuentra en el hígado, el bazo, el riñón y otros tejidos, pero cuya función no está clara en la actualidad.

En el contexto de deficiencia de actividad de β -GCasa, como ocurre en la EG, el sustrato GluCer se acumula. Además, como mecanismo adaptativo celular, el exceso de GluCer

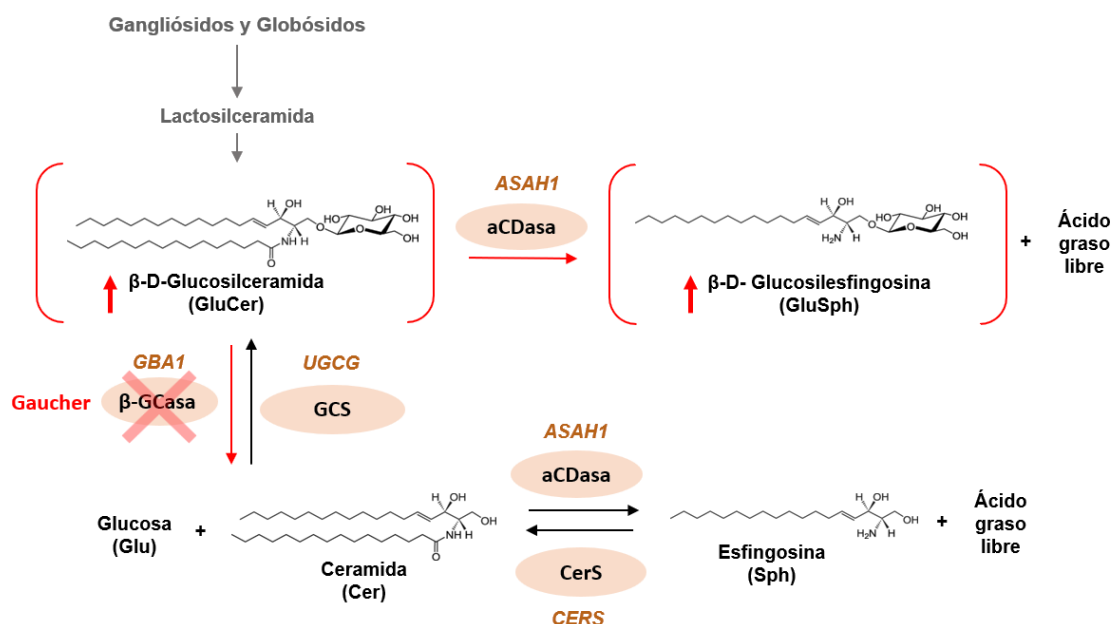


Figura 8. La β -D-glucosilceramida (GluCer) es escindida por la enzima glucocerebrosidasa (β -GCasa, codificada por *GBA1*) para generar ceramida libre (Cer). En condiciones fisiológicas, se produce una rápida hidrólisis de la GluCer en Cer, que luego se convierte en esfingosina (Sph) mediante la enzima ceramidasa ácida (aCDasa, codificada por *ASAH1*). La Sph es reacilada por la CerS (ceramida sintasa, codificada por *CERS*) para regenerar ceramida, y la Cer es glucosilada por la GCS (glucosilceramida sintasa, codificada por *UGCG*) para formar GluCer. En condiciones de deficiencia de β -GCasa, como en la enfermedad de Gaucher, se produce una acumulación de GluCer, y se favorece parcialmente su conversión en β -D-glucosilesfingosina (GluSph) mediante desacilación. Adaptada de Pradas et al. [26], Aerts et al. [49], y Revel-Vilk et al. [51].

se convierte parcialmente de manera activa por la ceramidasa en su derivado desacilado, β -D-glucosilesfingosina (GluSph, también denominada LysoGb1) [49] (Figura 8).

Clásicamente, se describen tres tipos de EG según la progresión clínica, aunque las evidencias respaldan que la EG es un espectro continuo de fenotipos y manifestaciones que abarcan desde la muerte fetal hasta adultos asintomáticos [52]. El tipo 1, el más frecuente, presenta afectación visceral, trombocitopenia, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia y lesiones óseas, atribuibles a la infiltración de células de Gaucher en médula ósea, bazo e hígado. Los tipos 2 y 3 incluyen, además, manifestaciones neurológicas, si bien se diferencian por el momento de inicio y la velocidad de progresión de los síntomas: el tipo 2 se presenta como el fenotipo más severo, con inicio temprano y una evolución rápida y aguda en comparación con el tipo 3. Este espectro clínico se enmarca en la heterogeneidad genética del gen *GBA1*, localizado en el cromosoma 1q21 y formado por 7 kb con 11 exones y 10 intrones, en el que se han identificado hasta la fecha más de 300 mutaciones patogénicas asociadas a pérdida o ganancia de función de la proteína [48]. Entre las variantes leves, la más representativa es p.N370S, asociada con la EG tipo 1, mientras que mutaciones más graves como p.L444P se relacionan con las formas neuropáticas de la enfermedad (EG tipos 2 y 3) [49,53,54]. Estas variantes patogénicas pueden impactar en la actividad β -GCasa lisosomal, describiéndose una correlación inversa entre la severidad de la mutación y el nivel de actividad enzimática [55]. Por ello, y aunque la secuenciación del gen *GBA1* permite identificar las variantes bialélicas patogénicas, la medida de la actividad enzimática sigue siendo recomendable para verificar la deficiencia como prueba funcional [39,52].

En este contexto fisiopatológico y clínico, se han propuesto varios biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de la EG, siendo la quitotriosidasa el primero descrito en 1994 [56]. En comparación, GluSph ha emergido posteriormente como un biomarcador más sensible y específico, con mayor capacidad discriminante que su análogo acilado, GluCer [57]. Su concentración en plasma permite monitorizar la respuesta al tratamiento y varía según la dosis administrada, aunque no correlaciona con algunas

manifestaciones clínicas, como la respuesta inflamatoria, la enfermedad ósea o la afectación neurológica.

1.2.5. *GBA1* como factor de riesgo de *Párkinson*.

La asociación clínica entre las mutaciones de *GBA1* y la EP se observó por primera vez hace décadas tras los informes de parkinsonismo en pacientes con EG [58,59]. Estos pacientes con EG y sus familiares no afectados presentaban variantes en *GBA1*, y en heterocigosis también conferían un riesgo significativo de desarrollar EP [60–62].

Se estima que entre el 2-30% de los pacientes con EP son portadores de variantes en *GBA1*, dependiendo de la población y región geográfica [10,47,62–65]. En nuestra población, se estima entre el 10-12% de los enfermos de EP [66]. Entre las mutaciones patogénicas más comunes en pacientes con EP se encuentran las mismas que en la EG, p.L444P (severa) y p.N370S (leve) [62,65,67]. Otras variantes, como p.E326K o p.T369M, predisponen al parkinsonismo, actuando como factores de riesgo para la EP, pero sin ser patogénicas para EG [10,54] (Figura 9). De hecho, p.E326K es una de las más prevalentes en pacientes con EP [48]. En Europa, p.D409H se ha descrito principalmente en el sur de España y Grecia [65]. La revisión de Parlar et al. [54] proporciona una base de datos de variantes de *GBA1* reportadas en EP, que también es posible consultar en su aplicativo: <https://pdgenetics.shinyapps.io/gba1browser/>.

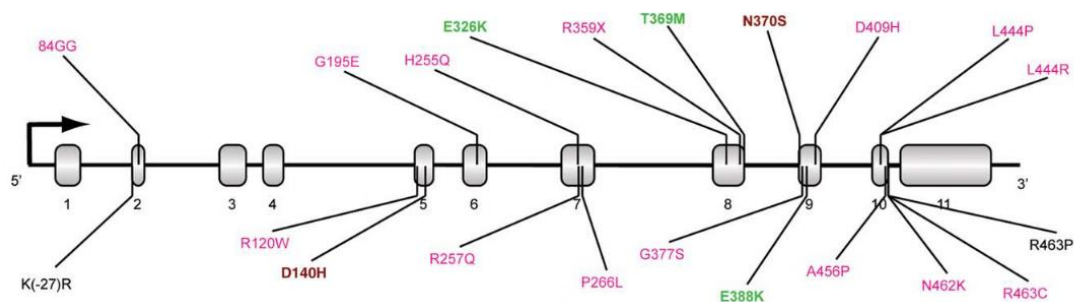


Figura 9. Distribución de las mutaciones en el gen *GBA1* asociadas a pacientes con enfermedad de *Párkinson*. Las mutaciones asociadas a enfermedad de Gaucher neuropática tipo 2 o 3 se indican en color rosa; las relacionadas con la forma leve no neuropática (como N370S), en marrón; las variantes de riesgo, en verde; y aquellas con fenotipo clínico no establecido, en negro. Adaptada de Liu et al. [68].

Desde el punto de vista clínico, la EP asociada a variantes en *GBA1* (EP-GBA) es difícilmente distinguible de la forma idiopática, aunque suele manifestarse, en promedio, cinco años antes, con un curso clínico más severo, y presenta una mayor frecuencia de síntomas no motores, como la disfunción autonómica y sexual, la hiposmia, los síntomas psiquiátricos, los trastornos del sueño, y el deterioro cognitivo [48,62,64,69–73] (Tabla 3). Estas características han llevado a considerarla una entidad clínica y biológicamente diferenciada [74]. En este contexto, recientemente se ha propuesto el término “síndrome de Sidransky” [75] para describir este fenotipo clínico característico, lo que ha contribuido a reconocer la EP-GBA como una forma diferenciada dentro del espectro parkinsoniano, con implicaciones clínicas, diagnósticas y terapéuticas relevantes.

Tabla 3. Manifestaciones clínicas de EP-GBA y EP idiopático.

	EP-GBA (Síndrome de Sidransky)	EP idiopático (no GBA)
Edad de inicio	Más temprano (3-6 años)	
Muerte	Más temprana (HR, 1,85)	
Síntomas motores	Inicio más temprano; progresión más rápida; a menudo más grave.	Inicio gradual con progresión más lenta
Síntomas no motores	Mayor prevalencia; aparición casi simultánea de síntomas motores y no motores.	Típicamente, los síntomas no motores aparecen mucho antes que los motores
Deterioro cognitivo	Mayor afectación de la memoria de trabajo, funciones ejecutivas y habilidades visoespaciales, con mayor riesgo de demencia manifiesta.	Común, pero generalmente menos severo.
Trastornos del estado de ánimo	Trastornos del estado de ánimo más frecuentes y graves, incluyendo depresión y ansiedad	Común, pero generalmente menos severo.
Trastornos del sueño	Más graves y más frecuentemente reportados, especialmente el trastorno de conducta del sueño REM (RBD).	Común, pero generalmente menos severo.
Disfunción olfativa	Más pronunciada.	Común, pero menos pronunciada.
Síntomas disautonómicos (incl. estreñimiento, disfunción vesical, hipotensión ortostática)	Mayor carga de síntomas secundarios a la disfunción del sistema nervioso autónomo.	Comunes, frecuencia similar, pero con menor sintomatología.
Respuesta al tratamiento	Menor eficacia con los tratamientos estándar de EP.	Generalmente responde bien a los tratamientos clásicos de EP

Adaptada de Skrahn et al. [74] y Huh et al. [76].

El estudio de Cilia et al. [67], en una cohorte de 2764 individuos, reportó que el 34,1% de los pacientes con EP y mutaciones en *GBA1* desarrollaron demencia, frente al 19,6% en pacientes no portadores (odds ratio, OR 3,2). Este incremento en el riesgo de deterioro cognitivo también se ha observado en otros estudios, con una probabilidad de hasta 5 y 20 veces mayor en individuos portadores de variantes y en pacientes con EG, respectivamente [47,61,63,64].

Además, la gravedad de la mutación en *GBA1* tiene un impacto en este riesgo [55,64,67]. Los portadores de mutaciones severas presentaron un riesgo casi 6 veces mayor de desarrollar EP (45% de los individuos) con una edad de inicio aproximadamente 5 años más temprana que los portadores de variantes leves, cuyo riesgo fue de 2,9 veces superior (25% de los individuos) al de los no portadores [67]. Estos hallazgos son consistentes con un estudio realizado en una cohorte de mil judíos Ashkenazi, donde se reportaron OR de 2,2 y 10,3 para variantes leves y severas, respectivamente [64]. En pacientes con EG, las mutaciones severas, asociadas a formas neuropáticas, se han vinculado con un aumento del 217% en el riesgo de deterioro cognitivo [68]. A los 70 años, el 72% de los portadores de mutaciones severas y el 38% de los portadores de variantes leves presentaban demencia [67]. Por ello, Mazzulli et al. [77] observó un aumento de α -sinucleína monomérica en tejido cerebral *post mortem* de pacientes con EG tipo I, sin manifestaciones neurológicas, mientras que en las formas neuronopáticas (tipos 2 y 3), el mayor compromiso del SNC se asoció con la acumulación de especies oligoméricas tóxicas.

Los modelos murinos con mutaciones en *Gba1*, por lo general, presentan disfunción lisosomal y una acumulación de esfingolípidos, que es más marcada en homocigosis [78–81], mientras que los modelos heterocigotos muestran mayor variabilidad, lo que sugiere que dependiendo de la copia funcional de *Gba1* podría ser suficiente para evitar esta acumulación [82]. A pesar de la disfunción lisosomal observada en estos modelos, no desarrollan agregados fibrilares de α -sinucleína ni reproducen la neurodegeneración dopaminérgica característica de la EP, por lo que no presentan deterioro clínico en funciones como la cognición, el olfato o la coordinación motora [83]. Para modelizar estas interacciones se han empleado diferentes aproximaciones. El cruce del modelo

murino A53T-*SNCA*, que sobreexpresa α -sinucleína, con ratones knock-in (KI) de *Gba1* con variantes como L444P o D409H, ya sea en heterocigosis u homocigosis [83,84], así como la administración a este modelo A53T-*SNCA* de inhibidores farmacológicos de β -GCasa, como condutiroil β -epóxido (CBE) [85], exacerba los déficits motores, la neurodegeneración y la acumulación cerebral de GluCer en comparación con los ratones A53T-*SNCA* con *Gba1* sin variantes, o A53T-*SNCA* no tratados con CBE, respectivamente. De forma complementaria, en ratones KI *Gba1* D409V/D409V, la patología sinucleinopática se indujo bien mediante el cruce con mThy1-h*SNCA*, un modelo de sobreexpresión de α -sinucleína, o bien mediante la inyección de fibrillas preformadas de α -sinucleína (PFFs) en el estriado; en el primer caso, se observó un incremento de α -sinucleína patológica acompañado de deterioro motor, sin evidencia de degeneración nigroestriatal, mientras que en el segundo la mutación no potenció en igual medida la carga patológica [86]. Por último, en ratones KI heterocigotos *Gba1* L444P de 8 meses, la administración de la neurotoxina mitocondrial dopaminérgica MPTP (1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina) produjo una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas en comparación con los WT tratados, junto con una exacerbación de déficits conductuales y neuroinflamación; estos síntomas tipo EP inducidos por MPTP se atenuaron tras incrementar *Gba1* mediante un vector AAV5-hGBA [87].

Estos hallazgos refuerzan el papel modulador de *GBA1* en determinados contextos de sobreexpresión de α -sinucleína. En presencia de una condición patológica de base, la disfunción de β -GCasa se torna clínicamente relevante, y su modulación impacta más visiblemente en la progresión de la enfermedad. Así, las variantes en *GBA1* no serían suficientes por sí solas para inducir la muerte de neuronas dopaminérgicas, pero sí aumentarían la susceptibilidad y la gravedad del fenotipo dependiendo de su interacción con otros factores, como el contexto genético, ambiental o el envejecimiento, lo que podrían explicar la variabilidad en la penetrancia y la expresividad clínica observada.

1.2.6. Mecanismos subyacentes de la enfermedad de Parkinson asociada a *GBA1*.

Dado que la actividad de la β -GCasa se ha identificado como un factor de riesgo para la EP, el desafío actual consiste en establecer los mecanismos subyacentes que explican esta asociación. Múltiples estudios han demostrado que la pérdida de actividad de β -GCasa resulta en la acumulación de α -sinucleína patológica, tanto en modelo celular [77,78,88], como murino [77,85,89,90], y tejido cerebral humano [25,77,91–93]. Este efecto, puede estar condicionado por diversos factores que regulan su actividad, como variantes en *GBA1* que afectan a su expresión génica o su estructura-función, alteraciones del pH lisosomal, disfunción en el tráfico mediado por LIMP-2, o una menor disponibilidad o interacción con saposina C; alteraciones en cualquiera de estos pasos podrían afectar potencialmente a la actividad β -GCasa y, en consecuencia, favorecer la acumulación de α -sinucleína [10].

Para explicar el vínculo entre *GBA1* y la patogénesis de EP se han propuesto diferentes mecanismos moleculares, no excluyentes, asociados tanto a las consecuencias de la pérdida de función enzimática como a la ganancia de función tóxica por la presencia de proteína mutante [26,48,94–97].

La pérdida de función de la β -GCasa conlleva a la acumulación de esfingolípidos y origina una disfunción lisosomal generalizada, que incluye alteraciones en el pH lisosomal, en el tráfico vesicular, en la actividad de otras hidrolasas lisosomales, y en la ALP [77,78,88,98–100].

La alteración lipídica resultante en la membrana lisosomal favorece la degradación de LAMP2A, lo que compromete la CMA [26,78,101]. Además, se ha propuesto recientemente que la propia β -GCasa mutante pueda bloquear directamente este receptor [25]. La pérdida de actividad CMA conlleva la acumulación de sus sustratos, entre ellos la α -sinucleína.

Los GSL forman parte de microdominios lipídicos junto con proteínas de membrana y desempeñan un papel clave en la señalización celular [46], por lo que su dishomeostasis altera también la estructura y funcionalidad de las membranas celulares. Además, esta

alteración modula la agregación de α -sinucleína, cuya unión a las bicapas es dependiente de su composición lipídica [26,48,102,103]. De hecho, múltiples estudios han demostrado que los GSL acumulados, como GluCer, GluSph y determinados gangliósidos, pueden interactuar directamente con α -sinucleína, estabilizar sus oligómeros e inducir su agregación, tanto *in vitro* como *in vivo* [77,78,91,104–107], contribuyendo así a la patogénesis de la enfermedad (Figura 10).

La disfunción lisosomal suele ir acompañada de una reducción de la mitofagia, lo que deriva en disfunción mitocondrial, y a su vez, en un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución en la producción de ATP [26,95,108–110]. Por otro lado, tanto la acumulación de lípidos como la de α -sinucleína actúan como señales proinflamatorias, capaces de activar la microglía y promover la liberación de citocinas inflamatorias [48,90,111].

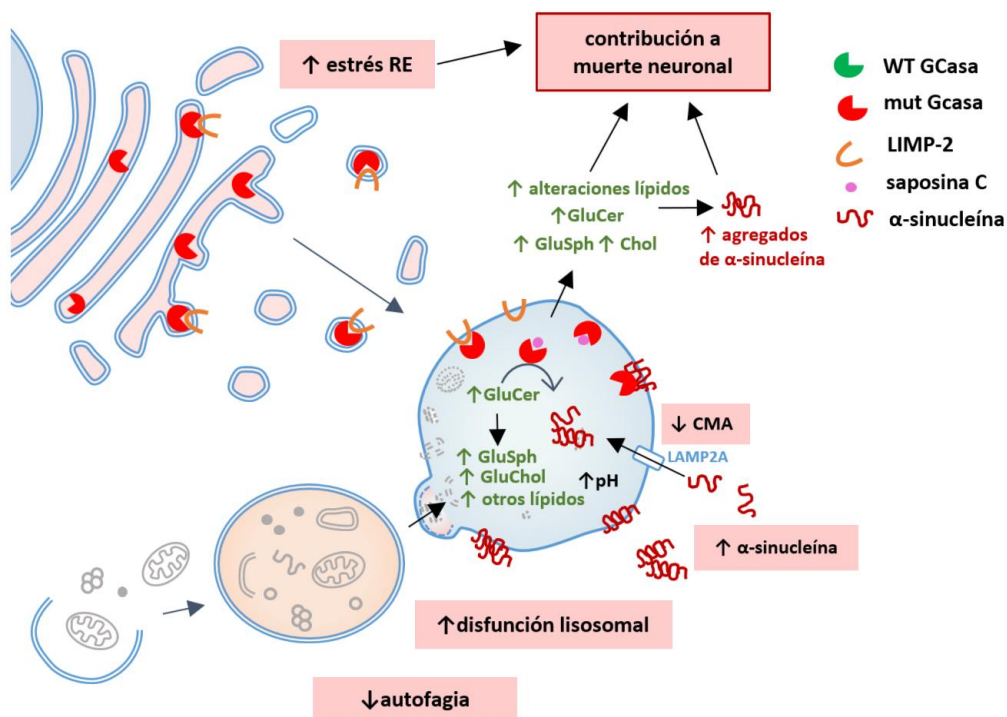


Figura 10. Detalle de las consecuencias de la deficiencia de β -Glcasa relacionadas con la vía autofagia-lisosoma. La retención parcial de β -Glcasa genera estrés en el retículo endoplasmático e inhibe el tráfico al Golgi. La pérdida de actividad lisosomal de β -Glcasa provoca la acumulación de GluCer y de otros lípidos como GluSph, colesterol y gangliósidos, tanto dentro como fuera del lisosoma. Estos cambios en el metabolismo lipídico pueden inducir un bloqueo de la CMA, disfunción lisosomal, e interactúan directamente con los oligómeros de α -sinucleína y los estabilizan. Adaptada de Pradas et al. [26].

La toxicidad también puede surgir a través de un mecanismo de ganancia de función. Las formas mutantes de la β -GCasa tienden a plegarse incorrectamente y quedar retenidas en el retículo endoplasmático, lo que genera estrés y activa la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) [77,78,98,112]. Este estrés puede inducir alteraciones en el tráfico retículo-Golgi y en la homeostasis del calcio [48,88,113]. A su vez, el estrés crónico del retículo endoplasmático puede impactar sobre otras vías interconectadas, como la autofagia, el estrés oxidativo y la función mitocondrial [78].

Por último, la propia acumulación de α -sinucleína puede interferir con el tráfico de la β -GCasa entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, reduciendo la cantidad de enzima que alcanza el lisosoma. Esto da lugar a un bucle de retroalimentación bidireccional, en el que la acumulación de α -sinucleína afecta a la función de la enzima y, a su vez, la disminución de la actividad de β -GCasa favorece la acumulación de α -sinucleína [77] (Figura 11).

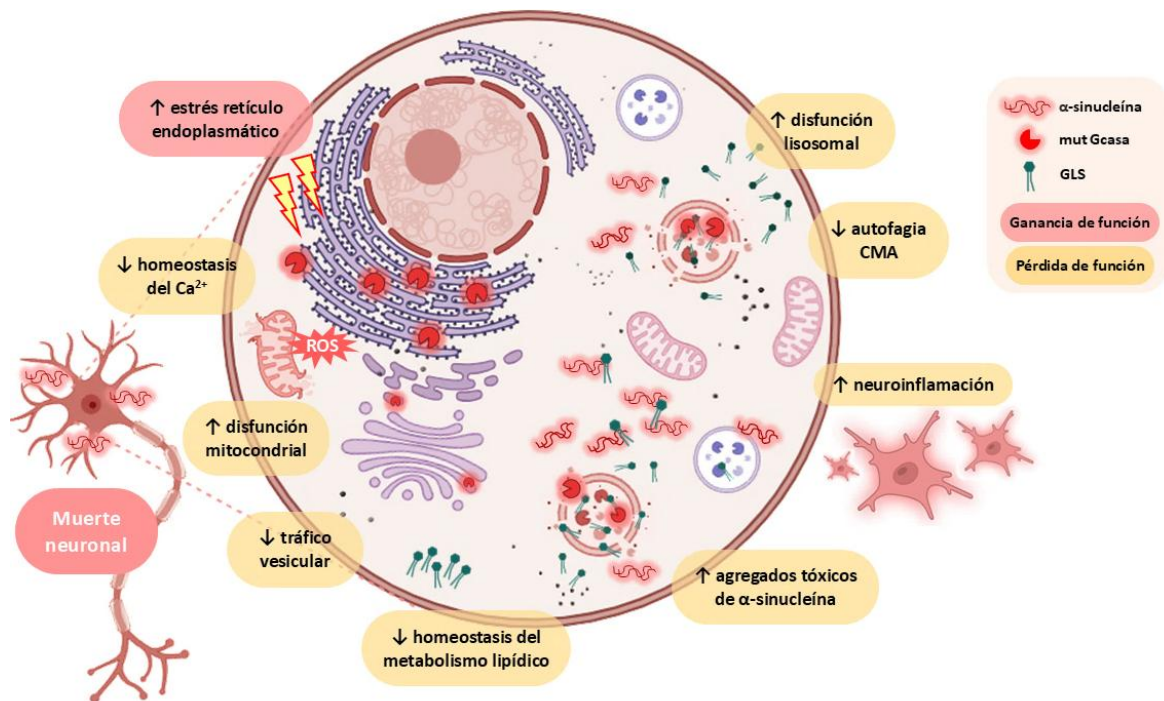


Figura 11. Resumen de los mecanismos de ganancia y pérdida de función en la célula implicados en la patogénesis de EP-GBA. Se ilustran los mecanismos patológicos interconectados que forman un bucle de retroalimentación: retención parcial de β -GCasa mutante (mut Gcasa) en el retículo endoplasmático con activación de la respuesta al estrés, disfunción lisosomal, bloqueo de la autofagia, disrupción del tráfico vesicular retículo-Golgi-lisosoma, formación de agregados tóxicos de α -sinucleína, desequilibrio lipídico con acumulación de glicoesfingolípidos (GSL), disfunción mitocondrial ($\downarrow$ ATP, $\uparrow$ ROS), dishomeostasis del calcio, y neuroinflamación mediada por activación microglial. Adaptada de Smith et al. [48] y Stojkovska et al. [97], creada con <https://BioRender.com>.

1.2.7. Terapias modificadoras de la enfermedad dirigidas a *GBA1*.

Hasta la fecha, no existen tratamientos capaces de modificar la progresión de la enfermedad. En 2024 se registraron 136 ensayos clínicos activos en fases I-III, de los cuales el 44 % correspondieron a tratamientos modificadores de la enfermedad. De ellas, las estrategias más representadas se dirigieron a la diana α -sinucleína, a vías relacionadas con *GBA1*, y a procesos inflamatorios [114] (Tabla 4).

Tabla 4. Ensayos clínicos activos como tratamientos modificadores de EP, actualización de 2024.

Categoría	Ensayos (n)	Ensayos (%)	Fase I	Fase II	Fase III
Dirigidos a α -sinucleína	9	15	1	8	
GBA1	7	12	2*	4**	1***
Antiinflamatoria	6	10	5	1	
Terapia celular	5	8	5		
Agonista de GLP-1R	5	8	1	3	1
Inhibidores de kinasa	5	8	1	4	
Mitocondria y energía	4	7		4	
Factores neurotróficos	4	7	2	2	
Microbioma	3	5	2		1
Antioxidante	2	3		2	
LRRK2	2	3	1	1	
Otros	9	13	2	6	
Total	60		22	35	3

*: PR001, Ambroxol; ** Ambroxol (3), BIA 28-6156; *** Ambroxol. Adaptada de McFarthing et al. [114].

Específicamente en EP-GBA, se están evaluando diversas estrategias terapéuticas en fases preclínicas y clínicas, muchas de ellas basadas en abordajes desarrollados previamente para la EG [74,115]. El número de ensayos modificadores de la enfermedad dirigidos a *GBA1* ha aumentado notablemente, de tres en 2023 a siete en 2024, con varios de ellos en fases II y III [114] (Tabla 4). Estas aproximaciones buscan incrementar la actividad de β -GCasa, reducir sus sustratos mediante la inhibición de su síntesis o mejorar su plegamiento y tráfico intracelular mediante chaperonas farmacológicas [115].

La terapia de reemplazo enzimático (ERT), tratamiento de referencia para la EG, se basa en la administración de la enzima recombinante. Sin embargo, las formulaciones

actuales (p. ej., imiglucerasa, velaglucerasa) no atraviesan la barrera hematoencefálica. En el contexto de la EP-GBA se investigan estrategias modificadas que optimicen la estabilidad y biodisponibilidad de la proteína recombinante en el SNC [74,115].

En cambio, la terapia génica busca proporcionar copias funcionales del gen directamente a la célula, siendo el uso de vectores virales adenoasociados (AAV) la estrategia más avanzada [82]. PR001, de *Prevail Therapeutics*, emplea un vector AAV9 para administrar copias funcionales de *GBA1* en el SNC, favoreciendo la producción endógena de β -GCasa funcional; se encuentra actualmente en fase I/IIa del estudio PROPEL (ID: NCT04127578) [114,116].

El uso de chaperonas farmacológicas tiene como objetivo mejorar la estabilidad de β -GCasa en el SNC. El ambroxol, originalmente desarrollado como mucolítico, ha demostrado que puede unirse a β -GCasa y mejorar su función en líquido cefalorraquídeo (LCR) (ensayos en curso: fase I/II, NCT06193421; fase II, NCT02914366, NCT05830396, NCT05287503; fase III, NCT05778617) [74,114,117–120]. Otras chaperonas también han mostrado no sólo incrementar la actividad enzimática, sino también reducir el acúmulo de α -sinucleína en células derivadas humanas y en modelos murinos, con mejoría de las manifestaciones neurológicas [121–123]. Por otro lado, BIA 28-6156, un activador alostérico, potencia la actividad actuando sobre la β -GCasa ya plegada, y se encuentra actualmente en fase II del ensayo ACTIVATE (NCT05819359) [74,114,124].

Por último, la terapia de reducción de sustrato (SRT) está diseñada para disminuir la carga de GSL en el SNC. En la EG, este enfoque ha mostrado cierto éxito con Miglustat y Eliglustat. Sin embargo, aunque el caso de Venglustat demostró efecto bioquímico y mayor penetración en el SNC [125], no se considera actualmente una vía prometedora tras la ausencia de beneficios clínicos durante el ensayo clínico de fase II MOVES-PD [126].

1.3. ESTUDIO DE GLUCOSILCERAMIDA Y GLUCOSILESFINGOSINA EN LA ENFERMEDAD DE PÁRKINSON ASOCIADA A *GBA1*

1.3.1. La importancia de la búsqueda de nuevos biomarcadores.

Los síntomas motores de la EP aparecen tras la pérdida del 60–80% de las neuronas dopaminérgicas [10], aunque algunos estudios han demostrado que este umbral podría reducirse al 30% [115]. En fases previas a la degeneración neuronal tienen lugar alteraciones bioquímicas que podrían ser detectables. Su identificación permitiría objetivar el diagnóstico en etapas iniciales, cuando los criterios clínicos son menos precisos, y facilitar el desarrollo de estrategias de intervención precoz.

La falta de biomarcadores dificulta tanto la selección (diagnóstico y estratificación) de pacientes candidatos como la monitorización objetiva de la eficacia de terapias emergentes modificadoras de la enfermedad, especialmente en esas fases iniciales, y en un contexto marcado por la heterogeneidad biológica y clínica de la EP. Esta limitación podría haber condicionado el fracaso de aproximaciones previas, al no haberse evaluado en subgrupos apropiados o en el estadio más pertinente de la enfermedad [115].

En la EP-GBA, además, estas necesidades son especialmente relevantes. Las diferencias fenotípicas respecto a la EP idiopática (Tabla 3) pueden facilitar la estratificación de subgrupos [127], con implicaciones pronósticas y terapéuticas, tanto para estimar la progresión de la enfermedad como para orientar potenciales tratamientos [115,128–130].

Por ello, en los últimos años, ha aumentado el interés por explorar mediadores de distintos mecanismos fisiopatológicos de la EP como posibles biomarcadores, entre ellos la disfunción mitocondrial, la neuroinflamación, el estrés oxidativo, las alteraciones lipídicas o la agregación de α -sinucleína [128,131–138]. En este contexto, el conocimiento de los mecanismos implicados en la EP-GBA ha dirigido la investigación hacia biomarcadores relacionados con las vías moleculares asociadas a *GBA1*. Entre ellos se incluyen la concentración y actividad de la propia β -GCasa, la evaluación de la actividad de otras enzimas lisosomales, o la acumulación de esfingolípidos [10,91,129,130].

1.3.2. El estudio de la actividad β -GCasa.

La actividad de β -GCasa ha sido uno de los principales biomarcadores explorados en EP-GBA, por su vínculo directo con el gen *GBA1*. Se ha observado repetidamente una disminución de la actividad de la β -GCasa en tejidos cerebrales *post-mortem* [92,93,139–144] y en fluidos biológicos, incluyendo plasma [145], sangre en gota seca (DBS) [55,146,147], y LCR [131,148–152], tanto en portadores de variantes en *GBA1*, como en EP no portadores, y durante el envejecimiento de individuos sanos.

Aunque la actividad β -GCasa disminuya en la sustancia nigra progresivamente con la edad [93,140,143,146,153], esta reducción es aún más pronunciada en pacientes con EP [93,143,149,154]. En concreto, Gegg et al. [140] observaron una reducción del 58 % en EP-GBA y del 33 % en EP idiopático frente a controles sanos, con un patrón similar reportado en LCR [149,155].

En el estudio de Alcalay et al. [146], esta menor actividad se mantuvo incluso tras ajustar por edad y excluir a portadores de mutaciones en *GBA1*, lo que refuerza la hipótesis de que la disfunción enzimática podría estar implicada en la fisiopatología de la EP más allá del contexto genético de *GBA1*, y la presencia de mutaciones en *GBA1* estaría exacerbando este efecto.

Por otro lado, algunos estudios han encontrado una asociación entre la actividad enzimática β -GCasa en DBS [55,154] o en LCR [151] y la gravedad de la mutación en *GBA1*.

Aunque ciertos trabajos no han demostrado una relación clara entre baja actividad y el fenotipo clínico [156], otros han sugerido que esta disminución podría predecir una progresión más rápida hacia demencia y un fenotipo clínico más severo [154,155,157].

1.3.3. Características del sustrato de β -GCasa y otros GSL relacionados.

La disfunción de β -GCasa ha motivado la cuantificación de su sustrato esfingolípido, GluCer, y otros derivados. El acúmulo de esfingolípidos no solo refleja las consecuencias de dichas alteraciones [91,158], sino que participa activamente en la patogénesis de la enfermedad [77] (subapartado 1.2.6). En este doble papel, las concentraciones de

GluCer y sus derivados emergen como potenciales indicadores de cambios celulares subyacentes.

GluCer presenta una estructura muy similar a la galactosilceramida (GalCer), ya que la D-glucosa y la D-galactosa son epímeros que difieren únicamente en la posición axial o ecuatorial, respectivamente, del grupo hidroxilo en el C4 del anillo de piranosa [42,158] (Figura 12).

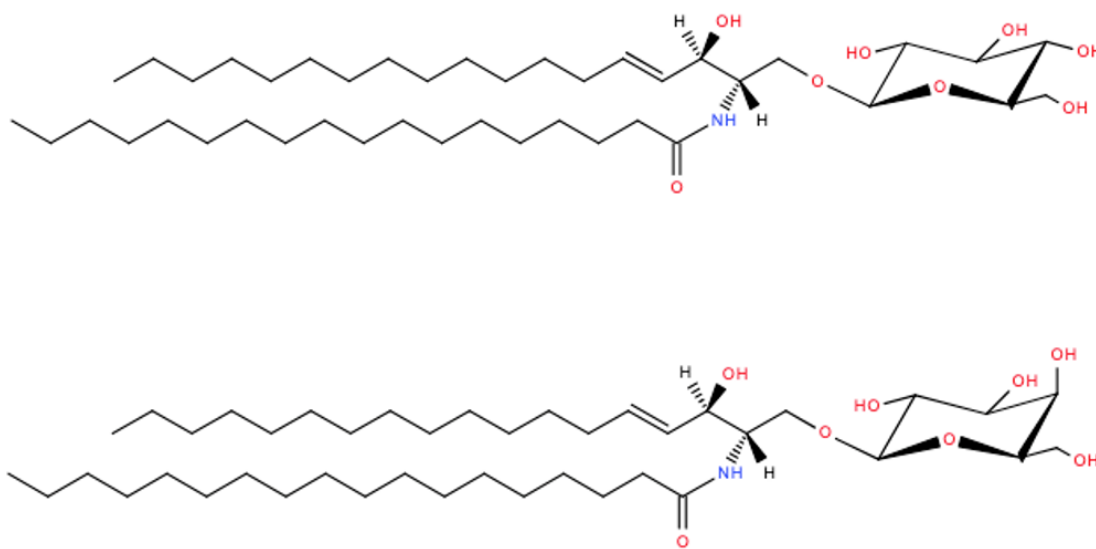


Figura 12. Estructuras de GluCer y GalCer d18:1/C18:0. Generadas usando el software LIPID MAPS® Structure Database (LMSD) [159].

Como se detalla en el subapartado 1.2.4., los GSL contienen dos cadenas hidrofóbicas: una derivada de la base esfingoide de cadena larga, habitualmente d18:1, y otra procedente de un ácido graso N-acilado, cuyas longitudes y grados de saturación pueden cuantificarse de forma conjunta, o individual (p. ej., C16:0). Los derivados desacilados de GluCer y GalCer, GluSph y galactosilesfingosina (GalSph o psicossina), respectivamente, también son isómeros. Según la metodología empleada, pueden cuantificarse conjuntamente bajo el término *hexosil*, como hexosilceramida (HexCer) o hexosilesfingosina (HexSph), respectivamente [158,160] (véase subapartado 1.4.3.).

GluCer y GluSph están presentes en todos los tipos celulares, localizándose principalmente en membranas de orgánulos intracelulares, incluidos lisosomas y retículo endoplasmático. En el aparato de Golgi, GluCer actúa como precursor de GSL complejos, como gangliósidos y globósidos, mediante la acción de glucosiltransferasas

específicas [42] (Figura 6). Estos GSL desempeñan un papel fundamental en la estructura, composición y organización de las membranas, en la formación de microdominios (*rafts*) lipídicos, en la adhesión, señalización y comunicación celular, y en procesos como la diferenciación, inflamación y tráfico intracelular (Figura 13A).

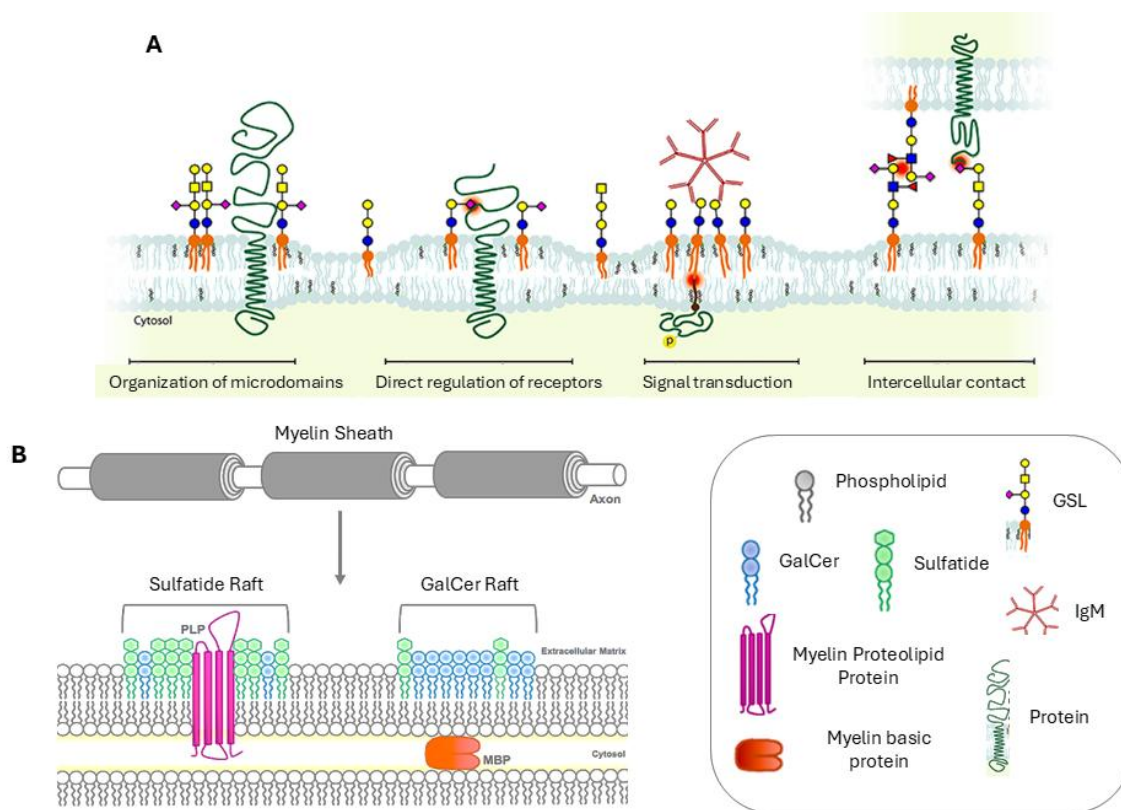


Figura 13. Modelo esquemático de las funciones de GluCer, GalCer y derivados, en la célula. A) GluCer y sus derivados forman parte estructural de las membranas celulares, cumpliendo funciones esenciales en la organización de microdominios, la adhesión celular, la señalización y la comunicación intercelular. **B)** GalCer y sus derivados sulfátidos son los principales GSL de la mielina y, debido a su elevada hidrofobicidad, contribuyen a su compactación y estabilidad. Adaptado de Zhang et al. [161] y Grassi et al. [162].

En cambio, GalCer y GalSph se limitan a tejidos específicos de mamíferos. GalCer y sus derivados, como los sulfátidos, son un componente principal de la vaina de mielina (20-25%), producida por oligodendrocitos en el SNC y por células de Schwann en el sistema nervioso periférico, y son esenciales para su compactación y estabilidad (Figura 13B) [160]. Por ello, en el cerebro y en el LCR, GalCer se encuentra en concentraciones mucho más elevadas, hasta diez veces superiores, que GluCer [158,160].

1.3.4. Cuantificación de GluCer (o HexCer) y GluSph (o HexSph) en diferentes matrices.

Los estudios sobre la cuantificación de dichos GSL en modelos *in vitro* e *in vivo* de EP-GBA han revelado variabilidad en los resultados. En modelos de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) derivados de pacientes con EP-GBA, tanto homocigotos como heterocigotos para mutaciones en *GBA1*, mostraron concentraciones incrementadas de GluCer en comparación con las derivadas de individuos sanos [88]. En la línea celular BE(2)-M17, *GBA1 knockout* (KO) y con mutación L444P, se observó un incremento de HexCer, y especialmente HexSph, mientras que las concentraciones de los mutantes en N370S fueron similares a la línea *GBA1* silvestre o *wild type* (WT) [78].

En modelos murinos *Gba1* KO [163] y en *Gba1* homocigotos para D409H, D409V, N370S y V394L [80], se ha documentado una acumulación destacada de GluCer y GluSph en diversos tejidos, como el cerebro, el hígado, los pulmones y el bazo. En cambio, en otro estudio con el modelo *Gba1* D409V/D409V, se observó un aumento de GluSph sin cambios en la concentración de GluCer en cerebro [82], patrón también reportado para las mutaciones L444P y N370S [79].

En matrices biológicas humanas, se ha reportado cierta variabilidad entre estudios. En sangre se han reportado cuantificaciones en suero, plasma, DBS, fibroblastos y células mononucleares (PBMCs), cuyos resultados se resumen en la Tabla 5. En general, en plasma se han descrito alteraciones en GluSph y GluCer. Se ha observado un incremento significativo de GluSph en heterocigotos para la variante N370S en comparación con no portadores, independientemente de la presencia de EP [164]. En cuanto a GluCer, algunos estudios informan concentraciones elevadas en pacientes con EP respecto a controles, sin diferencias entre portadores y no portadores de mutaciones en *GBA1* [165], mientras que otros trabajos han detectado un aumento en EP-GBA en comparación con EP idiopático y sujetos sanos [166]. Además, se ha descrito un gradiente en la concentración de HexSph en DBS, con concentraciones más elevadas en portadores de mutaciones patogénicas (L444P, N370S), seguidas de portadores de variantes polimórficas (E326K, T369M), pacientes con EP idiopática y, finalmente, individuos sanos [147].

Tabla 5. Resumen de estudios en sangre y células humanas para la medición de GluCer y GluSph en el contexto de EP.

Estudios en muestras humanas (I): Sangre y células		
Ref.	Matriz	Observación
[147]	DBS	EP-GBA (n=23) vs EPI (n=105) vs CS (n=88): GluSph ↑ , diferencias entre severidad de variantes GBA
[164]	Plasma	EP-GBA (HZ N370S) (n=20) vs CS-GBA (HZ N370S) (n=20) vs EPI (n=20) vs EG-EP (HO N370S) (n=4) : GluSph ↑ (para ambos grupos GBA (HZ N370S)); GluCer y GluSph ↑ (en EG-EP).
[165]	Plasma	EP (n=80, siendo 12 GBA (HZ E326K) y 1 GBA (HZ N370S)) vs CS (n=25, siendo 5 GBA (HZ E326K): GluCer ↑ (en EP); GluCer ≡ (entre EPI y EP-GBA).
[166]	Plasma	EP-GBA (n=48) vs EPI (n=8) vs CS (n=87): GluCer (C22:0, C24:0, C24:1) ↑
[167]	Plasma	EP con DC (n=26) vs EP sin DC (n=26) vs CS (n=5): HexCer (C16:0, C20:0, C24:0) ↑
[168]	Suero	EP-GBA (n=29) vs EPI (n=35, incluyendo 18 HZ LRRK2): HexCer ↑
[169]	Fibroblastos	EP-GBA HZ L444P (n=5) vs EPI (n=4) vs CS (n=4): SPL ↑ (SM, Cer, HexCer)
[166]	PBMCs	EP-GBA (n=48) vs EPI (n=8) vs CS (n=87): GluCer ≡

≈↑: *tendencia al alza no significativa*, ≡ : *no diferencias*; HZ: *heterocigoto*; HO: *homocigoto*; DC: *pacientes con deterioro cognitivo*; CS: *individuos control sanos*, EG-EP: *pacientes Gaucher con Parkinson*; EPI: *pacientes con EP idiopático no-GBA*, DBS: *sangre seca*; PBMCs: *célula mononuclear de sangre periférica*.

En estudios sobre tejido cerebral, se han analizado diversas regiones asociadas a patología Lewy o atrofia en la EP (Tabla 6). En pacientes con variantes en *GBA1*, no se observaron cambios en GluSph y GluCer total en putamen ni cerebelo, excepto por un incremento significativo de GluCer C24:0 en el cerebelo de individuos con EP-GBA [139]. Leyns et al. [91] evaluaron corteza cingulada, corteza frontal, putamen y cerebelo, detectando patología Lewy en las tres primeras; y aunque no se observaron variaciones en GluCer, sí se registró un aumento de GluSph, particularmente en los pacientes con enfermedad avanzada.

En la sustancia nigra, se han observado incrementos de GluSph de pacientes EP en comparación con el grupo control [142], así como un incremento de GluCer en EP-GBA y EP idiopático respecto a sujetos control [143]. Rocha et al. [93] reportaron elevaciones de GluSph tanto en sustancia nigra como en hipocampo en EP idiopático frente a controles sanos emparejados por edad.

Tabla 6. Resumen de estudios en tejido cerebral humano para la medición de GluCer y GluSph en el contexto de EP.

Estudios en muestras humanas (II): Tejido cerebral		
Ref.	Región	Observación
[91]	GC, CE	EP-GBA (n=28, con y sin DC) vs EPI (n=37, con y sin DC) vs CS (n=19): GluSph ↑, GluCer ≡ (excepto EP con DC: GluCer ≈↑)
[93]	HI, SN, CF	EPI (n=25) vs CS (n=29): GluSph ↑
[139]	PU, CE	EP-GBA vs EPI vs CS (n=5-14): GluCer, GluSph ≡
[142]	CF, SN	EP (n=15) vs CS (n=15): GluSph ↑
[143]	SN	EP-GBA (n=4) vs EPI (n=14) vs CS (n=20): GluCer ↑ y total GSL ↑ (para EP vs CS, sin diferencias entre EP-GBA y EPI)
[170]	GC, GTM, ES, CO	EP-GBA (n=21) vs EPI (n=21) vs CS (n=21): GluCer ≈/≈↑ (depend de región)
[171]	CT	EP (n=26) estadios II (6), III (10) y IV (10) vs CS (n=12): GluCer ≡, GluCer/GalCer ≈↑

≈↑: tendencia al alza no significativa, ≡ : no diferencias; HZ: heterocigoto; HO: homocigoto; DC: pacientes con deterioro cognitivo; CS: individuos control sanos, EG-EP: pacientes Gaucher con Párkinson; EPI: pacientes con EP idiopático no-GBA; GC: giro cingulado; CE: cerebelo, ES: estriado; PU: putamen; GTM: giro temporal medio; HI: hipocampo; CO: cortex occipital; CT: cortex temporal; CF: cortex frontal; SN: sustancia nigra.

Sin embargo, algunos trabajos presentan únicamente tendencias no significativas, posiblemente condicionadas por el tamaño muestral y la variabilidad interindividual. Por ejemplo, Boutin et al. [171] observaron una posible tendencia entre GluCer y la gravedad de la EP en la corteza temporal tras normalizar por las isoformas de GalCer, y Blumenreich et al. [170] detectaron tendencias no significativas de GluCer en la corteza occipital y el cuerpo estriado de EP-GBA.

Dado que el acceso al tejido cerebral humano es limitado, el LCR se emplea como una matriz indirecta para estudiar la patología cerebral (Tabla 7). En la cohorte del *Párkinson's Progression Markers Initiative* (PPMI), Huh et al. [172] reportaron concentraciones significativamente elevadas de GluCer en EP-GBA en comparación con EP idiopática e individuos sanos, con un gradiente creciente según la gravedad de la mutación. La ratio entre GluCer y esfingomielina (SM), GluCer/SM, emergió como el mejor marcador, mostrando también una correlación negativa con los niveles de α -sinucleína en LCR. Sin embargo, otros estudios no han encontrado diferencias en la concentración de GluCer en LCR entre pacientes con mutaciones en *GBA* y sujetos sanos

[166]. En uno de ellos, los pacientes con EP fueron analizados en un único grupo sin distinguir la presencia ni tipo de mutación en *GBA1* [173].

Tabla 7. Resumen de estudios en líquido cefalorraquídeo humano para la medición de GluCer y GluSph en el contexto de EP.

Estudios en muestras humanas (III): Líquido cefalorraquídeo	
Ref.	Observación
[151]	<u>Cohorte TUEPAC:</u> EP-GBA (n=51) vs EPI (n=45): GluCer ↑ (total y C24:0). Variantes de riesgo(n=1) vs leves (n=19) vs severas (n=17): GluCer ≈↑ <u>Cohorte PPMI:</u> EP-GBA (n=31) vs EPI (n=276) vs CS (n=122): GluCer ↑ (total, C24:0, C23:0, C22:0, C18:0). Variantes de riesgo (n=19) vs leves (n=8) + severas (n=4): GluCer ↑
[166]	EP-GBA (n=38) vs CS (n=39): GluCer ≈↑
[172]	EP-GBA (n=38) vs EPI (n=189) vs CS (n=114): GluCer ↑, GluCer/SM ↑
[173]	EP (n=33) vs CS (n=22): GluCer ≡
[174]	EP-GBA + DCL-GBA (n=84) vs EPI +DCLi (n=105) vs CS (n=40) vs EG-EP (n=5): GluCer ≡ (*sólo se mide GluCer C18:0); GluSph ↑ (en EG-EP)

≈↑: tendencia al alza no significativa, ≡ : no diferencias; HZ: heterocigoto; HO: homocigoto; DC: pacientes con deterioro cognitivo; CS: individuos control sanos, EG-EP: pacientes Gaucher con Párkinson; EPI: pacientes con EP idiopático no-GBA; TUEPAC: Tuebingen Parkinson Cohort, PPMI: Parkinson's Progression Markers Initiative; DCL: demencia con cuerpos de Lewy

En la misma cohorte PPMI, Lerche et al. [151] también observaron niveles significativamente elevados de GluCer total y sus isoformas C24:0, C23:0, C22:0 y C18:0 en EP-GBA en comparación con pacientes EP idiopático, siendo mayores en aquellos portadores de mutaciones severas. Además, se reportó una reducción en los niveles de α -sinucleína total en el LCR de EP-GBA. Sin embargo, en un estudio multicéntrico más reciente de los mismos autores [174] se analizaron las concentraciones de GluCer C18:0 y de GluSph en LCR, sin encontrar diferencias significativas entre grupos (EP y demencia con cuerpos de Lewy con/sin variantes en *GBA1*, y controles sanos), más allá de un discreto aumento en la media de GluSph en aquellos pacientes portadores de variantes *GBA1*. Dado el interés particular que se ha reportado previamente con las isoformas de cadena más larga, como C22:0, C23:0, C24:1 y C24:0 [139,151,166,171,173], se reconoce la necesidad de un enfoque dirigido específico para la cuantificación de estas especies [174]. Por otro lado, la cuantificación de GluSph en LCR ha sido poco explorada por la

complejidad metodológica, al presentar una concentración significativamente menor a la del plasma o tejido cerebral [175]; hasta la fecha, el estudio de Lerche et al. de 2024 [174] es el único que reporta su cuantificación en pacientes con EP.

Complementariamente a lo descrito, la extensa revisión de Muñoz et al. [176] recoge los datos publicados sobre la acumulación de α -sinucleína, lípidos y actividad de β -GCasa en diversas matrices biológicas. En modelos celulares, se ha descrito una correlación negativa entre la actividad de β -GCasa, la acumulación de α -sinucleína y la concentración de GluCer; sin embargo, la evidencia en muestras humanas es limitada.

A pesar de esta variabilidad, los sustratos de β -GCasa se han propuesto como biomarcadores para la estratificación de la enfermedad, su monitorización, o la predicción de la severidad. Sin embargo, el uso de métodos analíticos no estandarizados ha dificultado establecer una relación concluyente entre la acumulación de GluCer, la patogénesis de la EP-GBA y su potencial utilidad como biomarcadores.

1.4. PARTICULARIDADES DEL DESARROLLO DE MÉTODOS *IN-HOUSE* LC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GSL

La compleja estructura de los esfingolípidos dificulta su cuantificación en muestras biológicas. Para superar estas limitaciones, se han desarrollado diversas estrategias analíticas, siendo la combinación de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) la más utilizada [41,43].

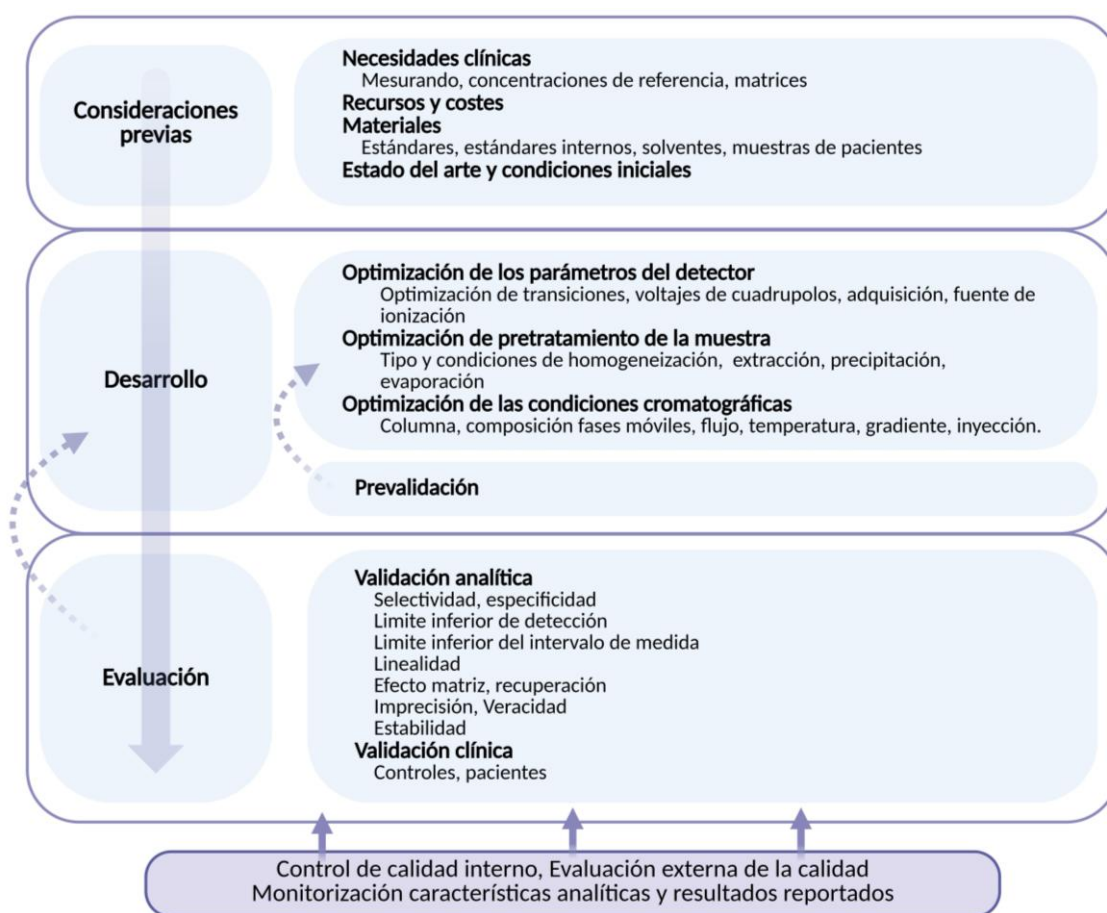


Figura 14. Flujo de trabajo para el desarrollo y la evaluación de métodos *in-house* basados en LC-MS/MS. Adaptada de Figura 37 de la CLSI C50 [177], incorporando aspectos basados en nuestra experiencia. Creada con <https://BioRender.com>.

Durante la optimización y evaluación de métodos LC-MS/MS desarrollados internamente (*in-house*), también denominados LDT (*Laboratory Developed Tests*) en el marco del Reglamento Europeo de Productos Sanitarios para Diagnóstico *In Vitro* (IVDR, 2017/746) [178], se abordan las múltiples variables que influyen significativamente en

su rendimiento [177]. En la Figura 14 se presenta un esquema con las consideraciones más relevantes.

Previamente al desarrollo de un método bioanalítico, es necesario definir las necesidades clínicas, los analitos de interés, las concentraciones esperables y las matrices biológicas a estudio. La revisión de estudios previos puede orientar la elección de condiciones iniciales. En el caso de las isoformas de GluCer, se han desarrollado métodos basados en LC-MS/MS en tejido cerebral de modelos animales, con aplicaciones tanto en estudios fundamentales como traslacionales [79,179]. Más recientemente, se han adaptado a muestras humanas, incluyendo tejido cerebral [91,139,170,171], sangre [180] y LCR [151,172,173,181].

A pesar de su versatilidad, sensibilidad y especificidad, los métodos basados en LC-MS/MS no son universalmente aplicables. Los principales desafíos en el análisis de esfingolípidos por LC-MS/MS incluyen la disponibilidad limitada de estándares y estándares internos (IS), la optimización de las condiciones de extracción para maximizar la recuperación de subclases específicas y minimizar interferencias, y el desarrollo de métodos cromatográficos que permitan la separación de compuestos isómeros e isóbaros que no puedan distinguirse únicamente por MS [41].

1.4.1. Optimización de parámetros del detector MS.

Cuando los compuestos entran en el espectrómetro de masas (MS), son ionizados y posteriormente separados según su relación masa/carga (m/z). Los métodos de ionización a presión atmosférica más utilizados son la ionización por electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). En el análisis basado en LC-MS, la combinación de una fuente de ionización ESI y un detector de triple cuadrupolo es la estrategia más comúnmente utilizada, tanto para el análisis de esfingolípidos [41], como en otras aplicaciones en el contexto de los laboratorios clínicos [182]. La elección del modo de ionización ESI (positivo o negativo) depende de la subclase de esfingolípido. Los neutros (ceramidas, esfingomielinas, cerebrósidos y GSL de tipo globo- y lactoseries) se detectan con mayor eficiencia en modo positivo, generando principalmente iones $[M+H]^+$; en cambio, los que contienen

grupos ácidos (principalmente gangliósidos y sulfátidos) requieren generalmente el modo negativo, que produce iones $[M-H]^-$ y ofrece mejor sensibilidad [183]. Por ello, en esfingolipidómica, la combinación de ambos modos de ionización resulta especialmente útil como estrategia para abordar el análisis de diferentes subclases lipídicas [184].

En matrices biológicas complejas pueden producirse fenómenos de supresión o intensificación de la señal en la fuente de ionización, que afectan a la sensibilidad, selectividad y reproducibilidad del método [185]. Parámetros como el voltaje capilar, el flujo de gas nebulizador y la temperatura de la fuente y de la línea de desolvatación (DL) influyen directamente en la formación del aerosol, la dispersión de los iones, la evaporación del solvente y la volatilización de la muestra [177,186,187]. La composición de la fase móvil tiene un impacto en la eficiencia de ionización y debe considerarse de forma integrada con el diseño cromatográfico. La optimización de los parámetros de la fuente es esencial para reducir la contaminación, favorecer la estabilidad de los analitos, y evitar condiciones excesivas que puedan aportar energía adicional a las moléculas, lo que podría generar fragmentación interferente en la propia fuente (*in-source fragments*, ISF), cuya m/z pueda coincidir, ocasionalmente, con el de otros lípidos analizados en la muestra [190,191]. Aunque algunos de los métodos descritos anteriormente publican los parámetros de la fuente utilizados [171,175,188–190], no es lo habitual.

La optimización del voltaje en la celda de colisión (CID) permite la fragmentación adecuada de los iones precursores sin comprometer la sensibilidad, habiendo patrones de fragmentación característicos de cada subclase de lípido [43,191]. En la fragmentación, los GSL neutros tienden a perder el residuo de azúcar, la cadena acilo, y una molécula de H_2O , generando un ión fragmento característico m/z 264, correspondiente a la base de esfingosina (d18:1) deshidratada, el cual se emplea para cuantificación por monitorización de reacciones múltiples (MRM), tal y como se ha descrito en las bases de datos de lipidómica (LIPID MAPS®) [192] y en publicaciones previas [43,79,171,183]. La SM típicamente produce al fragmentarse un ion característico de su grupo cabeza polar, la fosfocolina, a m/z 184, el mismo fragmento que generan también los fosfolípidos de colina (como fosfatidilcolina) [193]. En el caso de los lisoesfingolípidos, se pierde el grupo de la cabeza, manteniendo el fragmento de esfingosina a m/z 282 [188] (Figura 15).

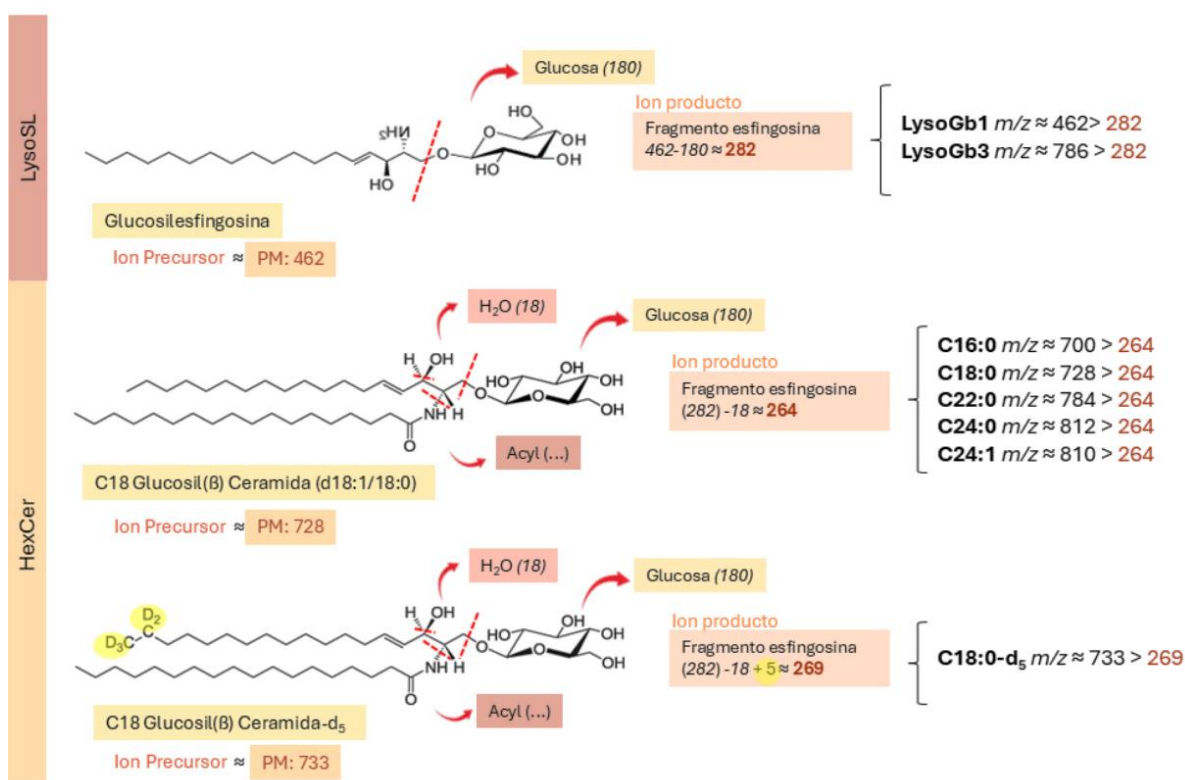


Figura 15. Mecanismo de fragmentación observado para GluSph, GluCerC18:0, y su análogo de deuterado, bajo ionización positiva. El esquema muestra las pérdidas neutras esperadas, los fragmentos característicos obtenidos y los iones hijos más representativos para la identificación por MRM.

Los compuestos isoméricos e isobáricos pueden generar interferencias en el detector MS dificultando la identificación y/o cuantificación de las especies. Los isómeros son compuestos que presentan la misma fórmula molecular y, por tanto, la misma m/z , pero difieren en su estructura. Para su distinción, se requiere habitualmente una separación cromatográfica previa, como en el caso de la glucosa y la galactosa, y/o un análisis en tándem MS/MS para formar fragmentos lipídicos característicos.

En cambio, la interferencia isobárica originada por la abundancia natural de los isótopos puede generar coincidencias en el m/z entre diferentes esfingolípidos no isómeros. Por ejemplo, el isotopólogo M+2 de la molécula insaturada HexCer C24:1 (que contiene dos átomos de ^{13}C) puede coincidir con la m/z de la forma monoisotópica de la especie saturada HexCer C24:0. Este tipo de interferencia se conoce como solapamiento isobárico tipo II, y es típica entre especies de la misma clase lipídica con distinto grado de insaturación. Por su parte, el efecto isotópico tipo I se refiere a la distribución

isotópica dentro de una misma especie molecular [191]. A medida que aumenta el número de átomos (especialmente de carbono), y la abundancia relativa del isótopo minoritario en cuestión (como ^{13}C , presente en un 1,1%), mayor es la probabilidad de que una molécula los contenga y, como consecuencia, disminuya su fracción monoisotópica. Este efecto no implica por sí mismo interferencias con otras moléculas, pero sí altera la intensidad relativa del pico base ($M+0$) respecto a sus isotopólogos [194]. En ambos casos, se recomienda aplicar factores de corrección basados en la abundancia isotópica natural para mejorar la exactitud de la cuantificación [191].

Por otro lado, en lipidómica se utilizan habitualmente tampones de acetato o formiato de amonio para favorecer la formación de iones $[M+H]^+$ y $[M+NH_4]^+$ en modo positivo, así como iones $[M-H]^-$, $[M+CH_3COO]^-$ o $[M+HCOO]^-$ en modo negativo [195]. Aunque estos son los aductos predominantes, también pueden generarse iones minoritarios como $[M+Na]^+$ o $[M+Cl]^-$, capaces de originar interferencias isobáricas adicionales si su m/z coincide con el de otras especies presentes; por ejemplo, dentro de una misma clase lipídica, un aducto de sodio puede solaparse con el ion protonado de otra especie que presente dos carbonos y tres dobles enlaces más [195].

Por último, en el análisis de compuestos con múltiples isoformas lipídicas, la interferencia por *product ion cross-talk*, en este caso, debida a la coincidencia de los iones producto en modo MRM y a una elución cromatográfica cercana, puede suponer una dificultad analítica. La inclusión de una “transición ficticia” o *dummy*, que comparte el ion producto pero emplea un ion precursor no presente en la muestra, puede ser útil para detectar este tipo de interferencias [196]. Un tiempo de pausa (*pause time*) más largo puede prevenir el *cross-talk* al permitir la eliminación de iones residuales de un compuesto A en la CID antes de analizar la siguiente transición de un compuesto B [185,196,197]. Asimismo, un mayor tiempo de adquisición (o *dwell time*) mejora la sensibilidad y precisión de la señal, pero reduce la capacidad de monitorizar múltiples transiciones.

1.4.2. Optimización del pretratamiento.

La preparación de la muestra es un paso crítico debido a la complejidad de las matrices biológicas. La elección del pretratamiento más adecuado dependerá de las propiedades fisicoquímicas del analito y de las consideraciones específicas del tipo de muestra [177]. Por ejemplo, el LCR presenta un contenido de lípidos bajo (0,2%) en comparación con el suero [198], por tanto, la recuperación de los analitos es crítica. En tejido, será necesario un paso previo de homogeneización, considerando la instrumentación, la temperatura, el solvente y el método de normalización de los resultados, que suele requerir la pesada de la muestra o la cuantificación de las proteínas totales.

La optimización del pretratamiento permite garantizar la reproducibilidad en la recuperación de analitos [199]. Entre los parámetros críticos se incluyen el tipo de extracción y los solventes. La extracción líquido-líquido (LLE) con solventes orgánicos es el método más ampliamente empleado. Los métodos clásicos de Bligh-Dyer [200] (cloroformo:metanol:agua 1:1:0,9, v/v/v) y Folch [201] (cloroformo:metanol:agua 2:1:0,8, v/v/v), basados en mezclas de metanol/cloroformo siguen considerándose estrategias robustas y eficientes para la extracción de lípidos, como se recoge en múltiples estudios y revisiones [43,194,198,199,202,203], y desde la iniciativa para estandarizar la lipidómica (*Lipidomics Standards Initiative*, LSI) [191].

También deben considerarse factores como la temperatura de los solventes y muestras durante el proceso de extracción, recomendándose temperaturas bajas que favorezcan la precipitación proteica por desnaturalización [198].

Asimismo, el tiempo de agitación debe optimizarse, determinando tanto la etapa en la que se realiza (antes o después de la adición de agua), como los tiempos, para garantizar una partición eficiente de los lípidos evitando inducir su degradación [203].

Es aconsejable evaluar el impacto de las extracciones secuenciales, ya que un mayor número de ciclos puede introducir una mayor variabilidad [199], pero, a su vez, puede suponer una mejora en la recuperación de los analitos [203].

1.4.3. Optimización de la cromatografía.

Las técnicas cromatográficas son importantes para reducir la supresión iónica, separar especies isómeras e isóbaras, y enriquecer las moléculas de interés frente a interferentes. Determinados parámetros impactan en el rendimiento de un sistema de cromatografía líquida, afectando a la eficiencia de la separación y la resolución de los picos [185]. Entre los más críticos se encuentran la selección de la fase estacionaria o columna, la composición de la fase móvil (incluyendo el tipo y proporción de solventes, pH y aditivos), el tipo de elución (el gradiente mejora la selectividad y reproducibilidad, aunque requiere mayor tiempo de equilibrado), el flujo (que acelera el análisis, pero puede comprometer la resolución), el volumen de inyección (que mejora la detección, aunque puede sobrecargar la columna y/o comprometer la resolución) y la temperatura de la columna (que influye en la viscosidad de la fase móvil y en la interacción del analito con la fase estacionaria).

En el análisis de esfingolípidos, el fraccionamiento y purificación del extracto lipídico se logra mediante técnicas de separación en *off-line* (extracción en fase sólida o SPE, cromatografía en capa fina) y/o *on-line* (cromatografía líquida de alta resolución o HPLC, cromatografía de fluidos supercríticos, o cromatografía de gases), siendo la HPLC la más utilizada [43]. Aunque para el análisis de esfingolípidos existen métodos que integran la SPE *on-line* [204], actuando como *trap column*, su aplicación se ha descrito mayoritariamente como procedimiento *off-line*, habitualmente como parte del pretratamiento de la muestra [199,205].

La HPLC permite la separación de los componentes de una muestra en función de su distribución entre una fase estacionaria sólida, o líquida adsorbida sobre un soporte sólido, y una fase móvil líquida. En la HPLC en fase reversa (RP-LC), la fase estacionaria es no polar y la fase móvil tiene una polaridad mayor, y el orden de elución de esfingolípidos depende en gran medida de la longitud y el grado de (in)saturación de la base esfingoide y/o del ácido graso. Así, a mayor longitud de cadena y menor número de insaturaciones, menor polaridad, y mayor retención en la fase estacionaria. El número y tipo de grupos funcionales polares también impacta en la polaridad e influyen en su orden de elución.

Las columnas más utilizadas en esfingolipidómica son C18 y C8 [43]. Aunque la RP-LC es ampliamente empleada para la separación de lípidos, su capacidad para discriminar entre determinadas variantes estructurales en los grupos de cabeza es limitada. Es el caso de la sustitución de glucosa por galactosa, ambas con espectros de masa idénticos, no puede resolverse con columnas convencionales de RP-LC, motivo por el cual se cuantifican conjuntamente como HexCer o HexSph [179].

En la cromatografía en fase normal (NP-LC), las especies lipídicas se separan principalmente según la polaridad de sus grupos de cabeza [41]. La fase estacionaria es más polar que la móvil, causando una mayor retención de los analitos polares a medida que disminuye la polaridad del eluyente [187]. La cromatografía de interacción hidrofílica (*hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC) se ha considerado históricamente como una variante de NP-LC porque emplea fases estacionarias polares (sílice, amino, ciano). No obstante, su fase móvil es similar a la de RP-LC, con altos porcentajes de acetonitrilo (95-97%) en agua [79,171–173,179], y su mecanismo de separación es más complejo [187], ya que depende de la distribución diferencial del analito entre la fase móvil rica en acetonitrilo y la capa acuosa adsorbida en la fase estacionaria hidrófila. Este fenómeno requiere tiempos de equilibrado prolongados para garantizar la reproducibilidad de los tiempos de retención (TR), lo que puede extender la duración del análisis [186,206]. Sin embargo, la cromatografía HILIC permite la separación de ambos isómeros glucosa y galactosa del grupo cabeza.

Por todo lo descrito en este capítulo, el consorcio de la LSI [207] ha subrayado la elevada complejidad de los análisis lipídicos en comparación con otras ómicas, y la necesidad de protocolos que favorezcan su estandarización. La página web de la LSI incluye borradores preliminares con directrices y recursos de interés orientados a estimular este proceso [191,208]. No obstante, para su aplicación en el ámbito clínico, los métodos de lipidómica deben validarse de acuerdo con las guías regulatorias vigentes [207].

1.5. EVALUACIÓN ANALÍTICA DE MÉTODOS *IN-HOUSE* BASADOS EN LC-MS/MS

1.5.1. Revisión de las recomendaciones de las guías internacionales.

Una vez optimizado, el método debe evaluarse siguiendo las guías regulatorias para asegurar su idoneidad para el propósito previsto.

Los aspectos clave, recomendaciones y especificaciones de la validación analítica de los métodos LC-MS/MS *in-house* se recogen de forma detallada en la Tabla 8. Esta incluye las guías principales que competen directamente a los laboratorios clínicos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) [177,185], y las que aplican a los métodos bioanalíticos, según la regulación de la Agencia Europea de Medicamentos [209] y la Administración de Alimentos y Medicamentos estadounidense (FDA) [210]. Aunque la FDA y la EMA habían publicado históricamente recomendaciones independientes para la validación de métodos bioanalíticos, ambas adoptaron en 2022 la directriz del Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH), en la Validación de Métodos Bioanalíticos, documento M10, como referencia común para la UE y EE.UU., respectivamente. A lo largo de este trabajo, las menciones a la actualización de la guía EMA de 2022 se entenderán como representativas de la ICH M10.

Si bien dichas guías ofrecen recomendaciones para la regulación de los procedimientos de evaluación entre laboratorios, su aplicabilidad puede verse limitada en determinados contextos. Con frecuencia la complejidad de las evaluaciones en el caso de métodos que implican múltiples analitos, tiempos de elución prolongados, y un procesamiento e interpretación de datos complejo, sumada a las limitaciones de tiempo y recursos, dificulta la adherencia y la armonización en el laboratorio clínico. Además, la falta de protocolos específicos para matrices de baja disponibilidad de volumen o con analitos endógenos, característicos del entorno clínico [211], así como la descripción poco detallada de los protocolos existentes, o la ambigüedad entre los criterios de aceptación, dificulta su implementación.

En ese sentido, uno de los aspectos más críticos es el estudio del efecto matriz, por su impacto en la sensibilidad, veracidad y precisión del método. Su evaluación implica analizar los factores que influyen en el rendimiento global del método y en la cuantificación del analito, incluyendo los efectos absolutos y relativos sobre la ionización, la recuperación y la compensación aportada por el IS en cada uno de estos parámetros. Dada su complejidad, se desarrolla de forma específica en el siguiente apartado.

1.5.2. Evaluación del efecto matriz, la eficiencia de la recuperación y la eficiencia del proceso.

El efecto matriz se define como una alteración en la eficiencia de ionización del analito debido a la presencia de compuestos coeluyentes en la matriz, lo que puede traducirse en una disminución (supresión iónica) o una potenciación de la señal [212]. La ESI es más susceptible a la supresión iónica en comparación con otras, como la APCI [213–215], ya que los componentes de la matriz que coeluyen con el analito pueden competir por la transferencia de carga en las distintas etapas de la formación de iones en fase gaseosa, dando lugar a una supresión de la señal [216]. Además del mecanismo de ionización, influyen también otros factores, como las propiedades fisicoquímicas del analito, la composición del fluido, el pretratamiento de las muestras y las condiciones cromatográficas [217–222].

Las estrategias más eficaces para compensar o reducir parcialmente los errores asociados al efecto matriz incluyen la preparación de los calibradores y controles de calidad en una matriz equivalente a la de las muestras nativas; la optimización del pretratamiento (etapas de extracción y/o purificación) para eliminar contaminantes endógenos; la optimización de la separación cromatográfica para evitar la coelución entre analitos y/o componentes de la matriz, y la elección de un IS apropiado [223–225].

Tabla 8. Resumen de las recomendaciones para la evaluación de métodos bioanalíticos basados en LC-MS/MS según las principales guías.

PARÁMETRO	CLSI C62 (2022) [185]	ICH M10 - EMA (2022) [209]	FDA (2018) [210]
Calibración y linealidad	Construir curva de cal de al menos 6 a 8 puntos distintos de cero, un blanco (sin std, sin IS) y un zero (sólo IS). Se resumen modelos matemáticos y ponderaciones posibles. Especif: No impacto en sesgo e imprecisión de muestras con conc. conocida. Como apoyo usar los resultados de las conc. retrocalculadas de los cal en múltiples series y R^2. Para la curva, utilizar la misma matriz biológica que las muestras. En casos justificados (como analitos endógenos), usar matriz proxy o sintética. Asegurar siempre comparabilidad con la matriz nativa, siguiendo estudio de <i>Efecto Matriz</i>. Refiere a EP06 [226]. <u>Monitorización de la curva:</u> (1) Del ajuste de la curva en cada serie: - Pendiente. Especif: basada en variabilidad durante validación. - Ajuste de la curva y conc. retrocalculadas. Especif: Mín: un $r^2 \geq 0.995$ y sesgo máx $\leq 15\%$ para cada conc. por encima del LLMi. (2) De los calibradores a nivel individual: - Áreas del IS (intraserie). Especif: CV$<5-10\%$. - Áreas ratio (intraserie). Especif: CV$<6\%$ para cada nivel de calibrador. - Conc. de los std (intraserie). Especif: Sesgo $<5-10\%$ respecto conc nominal. - Conc. de los std (intra e interserie). Especif: CV $\leq 15\%$ (excepto en LLMi de $\leq 20\%$). Los criterios pueden ser más estrictos (basado en variación biológica, recomendaciones clínicas de grupos de expertos, o regulaciones locales).	Construir curva de cal de al menos 6 puntos distintos de cero, un blanco (sin std, sin IS) y un zero (sólo IS). Especificación: En todas las curvas de la validación, sesgo $\pm 15\%$ respecto la conc. nominal en al menos $\geq 75\%$ de los std (para el LoQ de $\pm 20\%$). Para la curva, utilizar la misma matriz biológica que las muestras, si es posible. En casos justificados (matrices raras) usar matriz subrogada. Asegurar su validación con la matriz subrogada (sin protocolo).	Construir curva de cal de al menos 6 puntos distintos de cero, un blanco (sin std, sin IS) y un zero (sólo IS). Especificación: En todas las curvas de la validación, sesgo $\pm 15\%$ respecto la conc. nominal en al menos $\geq 75\%$ de los std (para el LoQ de $\pm 20\%$). Para la curva, utilizar la misma matriz biológica que las muestras, si es posible. En casos justificados (matrices raras) usar matriz subrogada. Asegurar su validación con la matriz subrogada (sin protocolo).

Tabla 8 (Cont.). Resumen de las recomendaciones para la evaluación de métodos bioanalíticos basados en LC-MS/MS según las principales guías.

PARÁMETRO	CLSI C62 (2022) [185]	ICH M10 - EMA (2022) [209]	FDA (2018) [210]
Límite del Blanco (LoB) y Límite de Detección (LoD)	No se recomienda definir el LoB ni LoD como parte de la evaluación, pero sí pueden ayudar a establecer el LLMl. Refiere a EP17 [227] para diseño experimental.	No se define protocolo.	No se define protocolo.
Límite inferior del intervalo de medida (LLMI) ^a / Límite de cuantificación (LoQ) ^b	Min. de 40 réplicas de 3 - 5 muestras en 5 series independientes. Refiere a EP17 [227]. Especificación: Precisión (CV) $\pm 20\%$ y veracidad (sesgo) $\pm 15\%$. S/N mínimo $\geq 10:1$ en el LLMl.	Min 5 réplicas en 2 - 3 series independientes. Especificación: Precisión (CV) $\pm 20\%$ y exactitud (sesgo) $\pm 20\%$.	Min 5 réplicas en 3 series independientes Especificación: Precisión (CV) $\pm 20\%$ y exactitud (sesgo) $\pm 20\%$. Señal mínima ≥ 5 del LoQ respecto al zero.
Precisión y veracidad ^a / exactitud ^b	Durante la pre-validación: Repetibilidad simple con 20 replicados por conc. (al 110% del LLMl, al 90% del ULMl y (LLMI+ULMI)/2). Precisión: Refiere a CLSI EP05 [228] para protocolo experimental (diseños de 20(días) x2(series) x2(replicados) para repetibilidad e imprecisión intermedia; 3x5x5 para reproducibilidad). Especificación: CV $< 15\%$, excepto LLMl ($< 20\%$). Adicionalmente, definida según el TEa, basado en variación biológica, recomendaciones clínicas de grupos de expertos, o regulaciones locales.	Evaluación conjunta de precisión y exactitud, a 4 conc. de QC (LLOQ, LOQ; MQC, HQC). Intraserie: 5 replicados. Interserie: Al menos 3 series con al menos dos de ellas independientes. Especificación: CV y sesgo $< 15\%$ excepto $< 20\%$ para LoQ.	Evaluación conjunta de precisión y exactitud, a 4 conc. de QC (LLOQ, LOQ; MQC, HQC). En al menos 3 series independientes, y ≥ 5 réplicas por serie. Especificación: CV y sesgo $< 15\%$ excepto $< 20\%$ para LoQ.
	Veracidad: Por comparación de métodos (CLSI EP09 [229]), materiales de referencia certificados (CLSI EP15 [230]); o <i>spikeando</i> conc. conocida de std en peso/vol en muestras con conc. conocida/blanco (CLSI C50 [177]) = estudio de recuperación si no hay opciones anteriores. Para este último, analizar mín 3 conc. con 5 replicados cada una, y calcular %conc. determinada respecto esperada (endógena + añadida). Especificación: definida según el TEa, basado en variación biológica, recomendaciones clínicas de grupos de expertos, o regulaciones locales.		

Tabla 8 (Cont.). Resumen de las recomendaciones para la evaluación de métodos bioanalíticos basados en LC-MS/MS según las principales guías.

PARÁMETRO	CLSI C62 (2022) [185]	ICH M10 - EMA (2022) [209]	FDA (2018) [210]
Selectividad y Especificidad	<u>Evaluación señal de muestras blanco</u>: No especifica protocolo. <u>Estudio de interferencias</u>: se recomienda verificar con potenciales interferentes endógenos o exógenos, medicación, suplementos, hemoglobina, bilirrubina, lípidos, conservantes, etc. También se recomienda evaluar pesos moleculares cercanos por potenciales aductos o pérdidas, isómeros o isóbaros, por su potencial causa de interferencias. Refiere a CLSI C50 [177]. Especificación: Para ambos estudios, la señal del blanco y/o de potenciales interferentes tiene que ser ausente o <20% de la respuesta del analito en el LLMI, o ≤5% para el IS.	<u>Evaluación señal de muestras blanco</u>: Al menos 6 fuentes/lotes diferentes de la matriz biológica. Adicionalmente, evaluar muestras lipémicas (al menos 1 lote) y hemolizadas (al menos 1 lote). <u>Estudio de interferencias</u>: Se debería evaluar aquellos metabolitos que puedan generar reacción cruzada, medicación exógena concomitante, isómeros. Especificación: Para ambos estudios, la señal del blanco y/o de potenciales interferentes tiene que ser ausente o <20% de la respuesta del analito en el LoQ, o <5% para el IS.	<u>Evaluación señal de muestras blanco</u>: Al menos 6 fuentes/lotes diferentes de la matriz biológica. <u>Estudio de interferencias</u>: Se debería evaluar aquellos metabolitos que puedan generar reacción cruzada, medicación exógena concomitante, isómeros, muestras lipémicas y hemolizadas. Especificación: Para ambos estudios, la señal del blanco y/o de potenciales interferentes tiene que ser ausente o <20% de la respuesta del analito en el LoQ, o <5% para el IS en sus TR correspondientes.
	<u>Monitorización de los TR</u>: Especificación: Variación <2,5% en la relación del TR del analito y del TR del IS entre series.		
	<u>Estudio de cross-talk</u>: especifica protocolo con transición <i>dummy</i> (CLSI C50 [177]). <u>Establecer iones cualificadores</u>: recomienda definir y monitorizar ratios entre ion cualificador y cuantificador. Especificación: (desv <20% respecto a media de los std; >20% en las muestras valorar posible interferencia; entre series en la curva puede ser problema de ionización). Refiere a CLSI C50 [177].		

Tabla 8 (Cont.). Resumen de las recomendaciones para la evaluación de métodos bioanalíticos basados en LC-MS/MS según las principales guías.

PARÁMETRO	CLSI C62 (2022) [185]	ICH M10 - EMA (2022) [209]	FDA (2018) [210]
Estabilidad	Verificar estabilidad de material QC. Se refiere a FDA [210] para detalles en protocolo. No define especificaciones.	Para los analitos en la matriz (incluida la estabilidad en poyata, la estabilidad a largo plazo y la congelación y descongelación): a dos niveles, LQC y HQC, y mín 3 replicados (de una misma preparación) por conc y por condición. Para la estabilidad a la cong/descong mín 3 ciclos. Especificación: Sesgo máx de $\pm 15\%$ respecto conc. nominal. Evaluar también la estabilidad de las muestras procesadas en el automuestreador, y la de las soluciones stock y WS. Sin protocolo ni especificación. Definir condiciones representativas de la práctica analítica real.	Para los analitos en la matriz (incluida la estabilidad en poyata, la estabilidad a largo plazo y la estabilidad a la congelación y descongelación): mín a dos niveles, LQC y HQC, y 3 replicados. Para la estabilidad a la cong/descong mín 3 ciclos. Especificación: Sesgo máx de $\pm 15\%$ respecto a la conc del QC fresco. Evaluar también la estabilidad de las muestras procesadas en el automuestreador, y la de las soluciones stock y WS. Sin protocolo ni especificación. Definir condiciones representativas de la práctica analítica real.
Arrastre	Referencia diferentes opciones: Refiere a la evaluación preliminar recogida en EP10 [231]. (3 conc., 10 muestras y 5 series, con evaluac. estadística, sin alternar blancos). Pero se recomienda el enfoque de la FDA [210], que cuantifica el grado en muestras blanco. Especificación: conc. más alta (incluso superior a ULMl) que no genere señal $\geq 25\%$ del LLMI. Refiere a CLSI NBS04 [232]: alternar muestras de alta conc. y muestras blanco al menos 5 veces. Especificación: cualquier señal de las muestras blanco ha de ser $< \text{LoD}$.	Alternar inyecciones de calibrador alto (ULOQ) y muestras de blanco. No se define nº de repeticiones. Especificación: La señal del blanco tiene que ser ausente o $< 20\%$ de la respuesta del LoQ, y $< 5\%$ en el caso del IS.	No especifica protocolo, indica que su impacto debe ser estudiado, y si es posible, eliminarlo. Especificación: La señal tiene que ser ausente o $< 20\%$ de la respuesta del LoQ.

Tabla 8 (Cont.). Resumen de las recomendaciones para la evaluación de métodos bioanalíticos basados en LC-MS/MS según las principales guías.

PARÁMETRO	CLSI C62 (2022) [185]	ICH M10 - EMA (2022) [209]	FDA (2018) [210]
Efecto Matriz	Práctica recomendada: Evaluación con 5 curvas de calibración (5 lotes de matriz a 7 conc.). Comparar la señal obtenida con el std añadido post-extracción (set2) frente a la señal obtenida con el std añadido al solvente o fase móvil (set1) (refiere a Matuszewski et al. [213] y CLSI C50 [177]). Realizar cálculos: del efecto matriz absoluto (%ME=100xset2/set1) para descripción de supresión iónica, del sesgo de efecto matriz (=100 – %ME), CV% de las áreas absolutas (contribución de la matriz a la imprecisión del método), sesgo de efecto matriz normalizado por IS (compensación del IS). Especificaciones: Sesgo de %ME <TEa. CV% áreas absolutas <15%. Sesgo de %ME-IS norm < Sesgo de %ME. Que cumpla requisitos predefinidos de sensibilidad o especificidad. También: Evaluación por experimento de mezclas, con mín 5 mezclas de 2 lotes diferentes en varias proporciones cada una (p.ej.: 100:0, 80:20, 50:50, 20:80, 0:100). Protocolo y especificaciones definidas en CLSI EP07 [233]. Este experimento cubre: la linealidad de las interacciones, potenciales efectos emergentes por combinación de lotes, y suma el efecto de la matriz durante la extracción. También: Evaluación cualitativa con estudio de infusión en columna T.	Evaluación de la precisión y exactitud de al menos 3 replicados a dos conc. (LQC y HQC) preparadas en al menos 6 matrices de diferentes fuentes/lotés. Se aceptan menos matrices en contextos de baja disponibilidad. Se recomienda verificar en muestras hemolizadas y lipémicas, y en individuos con distintas condiciones clínicas. Especificación: Sesgo respecto a conc. nominal y precisión (CV) <15% de los replicados intralote.	No se define protocolo ni especificaciones para métodos cromatográficos. Recomienda asegurar que no hay efecto matriz en al menos seis lotes de matriz independientes.
Eficiencia de la extracción^a / recuperación^b	Para protocolo se refiere a CLSI C50 [177]: comparación entre la señal del std añadido pre (set3) y post-extracción (set2), a 7 conc. y 5 lotes de matriz, según Matuszewski et al. [213] y calcular %RE=100xset3/set2 Especificación: no se define.	Comparación entre la señal del std añadido pre- y post-extracción. Recomendado a múltiples concentraciones (típicamente tres: L, M, H). Experimento independiente al efecto matriz. Especificación: La eficiencia de la recuperación no tiene por qué ser 100%, pero debe ser consistente entre analito e IS.	Comparación entre la conc. cuantificada del std añadido pre- y post-extracción a tres conc. (LQC, MQC, HQC). Especificación: La eficiencia de la recuperación no tiene por qué ser 100%, pero debe ser reproducible y consistente entre analito e IS.

Tabla 8 (Cont.). Resumen de las recomendaciones para la evaluación de métodos bioanalíticos basados en LC-MS/MS según las principales guías.

PARÁMETRO	CLSI C62 (2022) [185]	ICH M10 - EMA (2022) [209]	FDA (2018) [210]
Eficiencia del proceso	No se define como parámetro. En CLSI C50 [177], sí se define y se especifica la comparación de la señal obtenida con el std añadido pre-extracción (set3) frente a la señal obtenida con el std añadido al solvente o fase móvil (set1), a 7 conc. y 5 lotes de matriz, según Matuszewski et al. [213] y calcular $\%PE = 100 \times \text{set3} / \text{set1} = (\%ME \times \%RE) / 100$ Es posible combinar el estudio del efecto matriz, la eficiencia de la recuperación y la eficiencia del proceso en un experimento con los sets 1,2,3 de muestras (CLSI C50 [177]). Especificación: no se define.	No se define como parámetro No es posible cuantificar la contribución del efecto matriz y la eficiencia de la recuperación a la eficiencia global del proceso.	No se define como parámetro. No es posible cuantificar la contribución del efecto matriz y la eficiencia de la recuperación a la eficiencia global del proceso.

^aNomenclatura utilizada en CLSI C62 ^bNomenclatura utilizada en EMA y FDA.

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio; conc.: concentración; CV: coeficiente de variación; desv.: desviación; EMA: Agencia Europea de Medicamentos; FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos; HQC: control de calidad alto; ICH: Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano; LLMi: límite inferior de Intervalo de Medida; LLOQ/LoQ: límite inferior de cuantificación; LoB: límite de blanco; LoD: límite de detección; MQC: control de calidad medio; QC: control de calidad; S/N: señal/ruido; Std: estándar; TEa: error total permitido; TR: tiempo de retención; ULMi: límite superior de intervalo de medida; ULOQ: Límite superior de cuantificación; WS: solución de trabajo.

Los dos enfoques más utilizados para evaluar el efecto matriz son la infusión post-columna [219] y el *spikeo* pre- y post-extracción [213]. El primero proporciona información principalmente cualitativa, mientras que el segundo permite cuantificar la magnitud del efecto matriz. Como se detalla en la Tabla 8, no existe un consenso entre las guías, y los protocolos suelen simplificarse, centrándose principalmente en la evaluación de la parte instrumental.

Además del efecto matriz, otros conceptos clave deben considerarse para valorar el rendimiento global del método: la recuperación, entendida como la fracción del analito recuperada tras el procedimiento de extracción; la eficiencia del proceso, que refleja el efecto combinado de la matriz y la recuperación; y la veracidad y precisión, que se evalúan a partir de las curvas de calibración y permiten estimar el impacto global del método en la cuantificación del analito [213,234].

No siempre se disponen de metodologías que integren estos conceptos en un único diseño experimental, el cual permitiría una visión global del proceso y una comprensión más profunda de las causas y consecuencias del efecto matriz. Sin embargo, varios estudios han abordado esta integración, siendo especialmente relevantes aquellos que consideran la variabilidad entre lotes independientes de matriz y su normalización mediante el IS. Los trabajos de Matuszewski et al. [213,221,234] representan una contribución pionera en este ámbito, seguidos por estudios que han introducido modificaciones o enfoques complementarios [235–240].

Dado que los diferentes enfoques aportan información complementaria, una evaluación robusta debería integrar varias estrategias. Esto facilitaría la identificación de las causas subyacentes de dichos efectos, permitiendo así su minimización o, al menos, su control. Así, la integración de estrategias sistematizadas en los protocolos internos de validación podría promover la armonización de estos procesos en el laboratorio clínico.

En conjunto, los aspectos abordados a lo largo de esta introducción, incluidos los desafíos asociados al desarrollo y evaluación de métodos *in-house*, evidencian la complejidad de la identificación y cuantificación de nuevos biomarcadores. El avance en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la EP-GBA ha dirigido el interés hacia aquellos relacionados con la disfunción lisosomal, entre los cuales destaca la concentración de esfingolípidos sustratos y derivados de la actividad β -GCasa. Estas alteraciones podrían detectarse en muestras biológicas, lo que permitiría diferenciar a los portadores de variantes en *GBA1* de otros subtipos de EP. Sin embargo, la considerable variabilidad de los resultados entre estudios representa un reto para la comparación de grupos, dificultando la interpretación de los datos y, en consecuencia, su evidencia como potenciales biomarcadores. Uno de los principales factores que contribuyen a esta variabilidad es la falta de armonización en los métodos *in-house*.

2

Hipótesis y objetivos

2.1. HIPÓTESIS

La cuantificación de esfingolípidos en distintas matrices biológicas mediante métodos LC-MS/MS *in-house* robustos permite obtener información relevante en modelos experimentales y en estudios clínicos, apoyando su aplicación tanto en investigación preclínica como clínica sobre la EP-GBA.

2.2. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis es contribuir a la armonización y validación de métodos *in-house* basados en LC-MS/MS para la cuantificación de esfingolípidos, en el contexto de su exploración como posibles biomarcadores en la EP-GBA.

Los **objetivos específicos** son los siguientes:

1. Describir métodos basados en LC-MS/MS para la cuantificación de GluSph o HexSph y de las isoformas de GluCer o HexCer en tejido de modelos animales y en modelos celulares, aplicables a estudios de investigación básica y traslacional dirigidos a la caracterización de modelos y a la evaluación de la eficacia terapéutica.
2. Desarrollar y evaluar un método basado en LC-MS/MS para la cuantificación de isoformas de GluCer y GalCer en LCR humano, cumpliendo con los requisitos de selectividad, límite de cuantificación, linealidad, precisión, veracidad y estabilidad establecidos en las guías de validación de métodos bioanalíticos, para su aplicación en el ámbito clínico.

3. Implementar una estrategia sistematizada para la evaluación del efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso, integrando un flujo de trabajo que facilite la estandarización del análisis, el cálculo de los parámetros y la interpretación de los resultados, y aplicarla a la evaluación del método de cuantificación de isoformas de GluCer y GalCer en LCR humano.

4. Aplicar el método desarrollado para la cuantificación de isoformas de GluCer y GalCer en LCR humano como prueba de concepto, analizando las diferencias de concentración entre controles y pacientes con EP, y explorando su potencial utilidad como biomarcador de la enfermedad.

3

Materiales y métodos

Este capítulo incluye los Materiales y Métodos de uso general (apartado 3.1), así como los relativos a los métodos LC-MS/MS para la cuantificación de muestras en estudios preclínicos (apartado 3.2), vinculados a la Sección I de Resultados y al primer objetivo específico de la tesis, y los aplicados en estudios clínicos (apartado 3.3), los cuales se asocian a la Sección II de Resultados y al segundo, tercer y cuarto objetivos.

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3.1.1. Estándares y reactivos.

Los estándares 1- β -D-Glucosilesfingosina (d18:1) (2086) y Liso-globotriaosilesfingosina (d18:1) (LysoGb3) (1520) se obtuvieron de Matreya. Esfingosilfosforilcolina (d18:1) (LysoSM) (860600), C16 Glucosil(β)-Ceramida (d18:1/16:0) (860539), C18 Glucosil(β)-Ceramida (d18:1/18:0) (860547), C24:1 Glucosil(β)-Ceramida (d18:1/24:1(15Z)) (860549), C24:1 Galactosil(β)-Ceramida (d18:1/24:1(15Z)) (860432), C17 Glucosil(β)-Ceramida (d18:1/17:0) (860569) y los IS deuterados Glucosil(β)-Esfingosina-d5 (860636), C18 Glucosil(β)-ceramida-d5 (860638), Liso-globotriaosilesfingosina-d7 (860682), Esfingosilfosforilcolina-d7 (860639) se adquirieron en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EE.UU.). C22 Glucosil(β)-Ceramida-d4 (d18:1/22:0-d4) (9003462) y C22 Galactosil(β)-Ceramida-d4 (d18:1/22:0-d4) (9003461) se obtuvieron de Cayman Chemical (Michigan, EE.UU.).

El metanol (MeOH) y el cloroformo (CHCl₃), de calidad LCMS, procedían de VWR Chemicals (Radnor, PA, EE.UU.). El ácido fórmico (FA, pureza: >99%) se adquirió a ITW Reagents PanReac (Barcelona, ES). El formiato de amonio (Amm. Form., pureza: >99%), el isopropanol (IPA) de calidad LCMS, y el hidroxitolueno butilado (BHT) se obtuvieron de Sigma Aldrich (St Louis, MO, EE.UU.). El acetonitrilo (MeCN) de calidad LCMS fue suministrado por ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.). El agua ultrapura se generó utilizando un sistema Mili-Q (Millipore).

La matriz de LCR artificial (aLCR) se adquirió a Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido).

3.1.2. Equipamiento.

Los esfingolípidos se analizaron por LC-MS/MS utilizando un sistema HPLC Nexera X2 acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo LCMS-8050 (Shimadzu Corporation, Japón). Las columnas cromatográficas Mediterranea Sea18 Column 1,8 μ m 5 x 0,21 cm (TR-010902) y HALO® HILIC, 90 Å, 2 μ m, 2,1 x 150 mm (HAL-91812-701) se adquirieron de Teknokroma (Barcelona, ES).

Todos los datos de los cromatogramas se analizaron con el software LabSolutions CS v5.9 (Shimadzu Corporation).

3.1.3. Preparación de las soluciones stock de estándares e IS.

Las soluciones stock se prepararon disolviendo los estándares e IS puros en MeOH:CHCl₃(1:2, v/v) a las siguientes concentraciones: 5 mg/mL para GluSph, 1 mg/mL para LysoGb3, 1 mg/mL para LysoSM, 5 mg/mL para GluCer C16:0, 5 mg/mL para GluCer C18:0, 5 mg/mL para GluCer C24:1, 5 mg/mL para GalCer C24:1, 5 mg/mL para GluCer C17:0, 1 mg/mL para GluSph-d5, 0,1 mg/mL para LyoGb3-d7, 1 mg/mL para LysoSM-d7, 1 mg/mL para GluCer C18:0-d5, 1 mg/mL para GluCer C22:0-d4 y 1 mg/mL para GalCer C22:0-d4. Las soluciones stock se conservaron a -80°C hasta su consumo, o durante un máximo de 12 meses.

3.1.4. Preparación de soluciones intermedias.

Las soluciones intermedias de cada estándar e IS se prepararon diluyendo las soluciones stock en MeOH:CHCl₃(1:2, v/v) a distintas concentraciones finales: 1,085x10⁵ nM para GluSph (1/100 de stock), 1,428x10⁵ nM para GluCer C16:0 (1/50 de stock), 1,373x10⁵ nM para GluCer C18:0 (1/50 de stock), 1,234x10⁵ nM para GluCer C24:1 (1/50 de stock) y 1,234x10⁵ nM para GalCer C24:1, 7,002x10⁴ nM para GluCer C17:0 (1/100 de stock), 3571 nM para GluSph-d5 (1/600 de stock), 4,547x10⁴ nM para GluCer C18:0-d5 (1/30 de stock) y 4,229x10⁴ nM tanto para GluCer C22:0-d4 como para GalCer C22:0-d4 (1/30 de stock). Las soluciones intermedias se conservaron a -20°C durante un máximo de 6 meses.

3.1.5. Optimización de los métodos.

Para cada uno de los métodos, se evaluaron distintos solventes para la preparación de las soluciones de trabajo (WS) y las curvas de calibración, incluyendo MeOH:CHCl₃,

MeCN, H₂O o matrices subrogadas como el aLCR. Asimismo, se optimizaron tanto la composición como el volumen de los solventes empleados en la cromatografía, así como para la preparación de las distintas WS, curvas de calibración, y pretratamientos. También se optimizaron otras condiciones del pretratamiento, como el modo y los tiempos de agitación, homogeneización y extracción. La concentración final de los IS en los WS(IS) se ajustó en cada caso para generar señales coherentes con la respuesta esperada dentro del intervalo de medida definido.

Los protocolos de pretratamiento y los intervalos de medida de las curvas se optimizaron utilizando muestras nativas, mientras que los parámetros de detección MS y las condiciones cromatográficas se ajustaron empleando soluciones concentradas en MeCN, tanto de estándares individuales puros como de mezclas conjuntas (*tunning mix*), con el objetivo de maximizar la señal durante la optimización.

Algunos aspectos derivados de las fases de optimización, como la concentración seleccionada para los WS, las concentraciones de las muestras de control de calidad (QC) o el rango de las curvas de calibración, se describen en las secciones 3.2 y 3.3 del presente capítulo de *Materiales y Métodos* por razones de claridad expositiva, aunque correspondan a resultados obtenidos durante el proceso.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS SECCIÓN I: RELATIVOS A LOS MÉTODOS LC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GSL EN MODELOS PRECLÍNICOS

3.2.1. Obtención de las muestras de modelos preclínicos.

3.2.1.1. Muestras de pellets celulares. Los pellets celulares se obtuvieron a partir de la línea celular de neuroblastoma humano BE(2)-M17, con código ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*) 95011816. Esta línea, WT para *GBA1*, junto con las líneas derivadas para expresar mutaciones en *GBA1* KO, N370S, y L444P, fueron cultivadas y diferenciadas hacia un fenotipo dopaminérgico siguiendo los protocolos previamente descritos [78]. El cultivo, el mantenimiento de las líneas y la obtención de los pellets fueron realizados en el laboratorio del grupo de Enfermedades Neurodegenerativas del VHIR.

3.2.1.2. Muestras de tejido y suero de ratón. El modelo animal utilizado fue el modelo murino KI para la mutación *Gba1* D409V (Jackson Laboratory, stock #019106). Se obtuvieron muestras de suero, hígado, bazo y cerebro de ratones con los tres genotipos: WT, heterocigoto (HZ) y homocigoto (HO) para la mutación. El manejo de los animales y la obtención de las muestras fue realizada en el laboratorio del grupo de Enfermedades Neurodegenerativas del Instituto de Investigación Vall d'Hebron (VHIR).

3.2.2. Cuantificación de HexCer y HexSph en pellets celulares y muestras de tejido de modelo de ratón.

3.2.2.1. Cuantificación de proteínas. La concentración total de proteínas en los lisados celulares y en los homogenados de los tejidos se midió mediante el ensayo colorimétrico de ácido bicinonínico (BCA), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Este procedimiento fue realizado en el laboratorio del grupo de Enfermedades Neurodegenerativas del VHIR, siguiendo las indicaciones del fabricante. La

concentración de proteínas se empleó para normalizar y expresar la cuantificación de esfingolípidos en relación con la cantidad de muestra analizada.

3.2.2.2. Preparación de las soluciones WS(STD)_{CT-RP} y WS(IS)_{CT-RP}. Las WS específicas para el estudio de pellets celulares y tejido con RP-LC, tanto de estándares, WS(STD)_{CT-RP}, como de IS, WS(IS)_{CT-RP}, se prepararon a partir de las soluciones intermedias, mediante mezclas de estándares e IS, respectivamente. La WS(STD)_{CT-RP} incluyó una mezcla de GluSph, GluCer C16:0, C18:0, y C24:1 en MeOH:CHCl₃ (1:2, v/v) a una concentración final de 200 nM. Esta solución se utilizó para preparar la curva de calibración. La WS(IS)_{CT-RP} contenía una mezcla de GluSph-d5, GluCer C18:0-d5, GluCer C22:0-d4 y GluCer C17:0 en MeOH:CHCl₃ (1:2, v/v) con 0,01% de BHT, a 3 nM para la forma desacilada, y a 200 nM para las aciladas. Las WS se prepararon de forma fresca para cada serie analítica y se utilizaron una única vez. El volumen de WS(IS)_{CT-RP} se preparó en función del número de muestras de la serie. La Figura 16 muestra un esquema representativo de la preparación de las distintas soluciones empleadas en este y en los demás métodos descritos en la tesis.

3.2.2.3. Preparación de la curva de calibración y los controles de calidad internos. El punto inicial de la curva de calibración se estableció con el WS(STD)_{CT-RP} a 200 nM, y a partir de este, se prepararon por dilución seriada seis puntos adicionales a 50; 5; 0,5; 0,1; 0,05 y 0,025 nM, y un blanco, en MeOH:CHCl₃. La curva fue de un solo uso para cada serie analítica.

Los QC internos se prepararon a partir de un pool leucocitos sonicados de muestras sobrantes del laboratorio asistencial, a los que se les añadió 5 y 10 pmol de los estándares GluSph, GluCer C16:0, C18:0, y C24:1. Se alicuotaron y se mantuvieron congelados a -80°C. Los QC se emplearon para evaluar la precisión del método.

3.2.2.4. Monitorización analítica. Los métodos empleados en el análisis de muestras preclínicas no fueron validados siguiendo las guías bioanalíticas internacionales, dado que su aplicación se limitó a estudios preclínicos exploratorios. No obstante, se

implementaron procedimientos de monitorización interna para verificar la coherencia analítica a lo largo del tiempo.

Entre los años 2020 y 2025, se analizaron la precisión y veracidad interserie de las concentraciones retrocalculadas de los estándares a partir de 12 curvas de calibración correspondientes a 12 series analíticas independientes distribuidas a lo largo de ese período. Asimismo, se calcularon los CV (%) interserie de los controles internos ajustados por un factor de normalización. Este factor se definió en cada serie como la media de los cocientes entre la concentración nominal y la concentración medida en ambos niveles de QC, analizados al inicio y al final de la secuencia, y se aplicó a los propios QC y a todas las muestras correspondientes.

3.2.3. Cuantificación de HexSph en suero de ratón.

El método *in-house* basado en LC-MS/MS para la cuantificación simultánea de lisoesfingolípidos, HexSph, LysoGb3 y LysoSM en suero humano, previamente validado en el entorno asistencial para el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades de EG, Fabry y Niemann-Pick tipo A/B, respectivamente, fue aplicado sin modificaciones para la cuantificación de HexSph en muestras de suero de ratón procedentes de estudios preclínicos.

A continuación, se describen la preparación de las soluciones y las condiciones del método, basados en la publicación de Polo et al. [188].

3.2.3.1. Preparación de soluciones WS(STD)_{SUE-RP} y WS(IS)_{SUE-RP}. A partir de las soluciones stock de los estándares GluSph, LysoGb3 y LysoSM, se generan tres WS (WS(STD)_{SUE-RP}) independientes en MeCN:FA 0,1%, mediante diluciones de 1/100, 1/10 y 1/100, respectivamente. Las WS(STD)_{SUE-RP} se utilizaron para preparar los QC y la curva de calibración. A partir de las soluciones stock de los IS GluSph-d5, LysoGb3-d7, LysoSM-d7, se preparan soluciones intermedias en MeOH:CHCl₃(1:2, v/v), a las concentraciones finales de 1000 nM, 100 nM y 1060 nM, respectivamente. A partir de ellas se preparó una única WS(IS)_{SUE-RP} en MeCN, con una mezcla de estos mismos, a 1nM, 3nM y 5nM, respectivamente. Las soluciones intermedias de IS se conservaron a -20 °C durante un

máximo de 6 meses. Las soluciones de trabajo $WS(STD)_{SUE-RP}$ y $WS(IS)_{SUE-RP}$ se prepararon frescas para cada serie analítica. La Figura 16 muestra un esquema representativo de la preparación de las distintas soluciones empleadas en este y en los demás métodos descritos en la tesis..

3.2.3.2. Preparación de la curva de calibración y los controles de calidad internos. La matriz de los QC y calibradores se obtuvo a partir de suero humano deplecionado con carbón activo. La curva de calibración se preparó mediante diluciones seriadas a partir de los $WS(STD)_{SUE-RP}$, a 10 concentraciones (400; 200; 100; 50; 10; 5; 1; 0,5; 0,25 y 0,125 nM), e incluyendo un blanco. Los QC se prepararon a cinco concentraciones (200; 20; 5; 1 y 0,5 nM).

3.2.3.3. Pretratamiento. 50 μ l de muestra, QC, o calibrador, incluyendo el blanco, se precipitaron añadiendo 250 μ l de $WS(IS)_{SUE-RP}$, vorteadando durante 10 segundos, y sonicando posteriormente en baño de ultrasonidos durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugaron 15 min a 13000 rpm a 4°C, y se trasvasaron 200 μ l de sobrenadante a viales de cromatografía para su análisis.

3.2.3.4. Condiciones LC-MS/MS. Se inyectaron 3 μ L en el sistema cromatográfico, equipado con una columna C18 de fase reversa y un gradiente binario: fase móvil A (H_2O + 0,1% FA) y fase móvil B (MeCN + 0,1% FA), a un flujo de 0,4 mL/min y un tiempo de 7 minutos. El MS se configuró en modo positivo utilizando una fuente ESI, operando en modo MRM para GluSph (m/z 462.3>282.4), LysoGb3 (m/z 786.3>282.4) y LysoSM (m/z 465.2>184.0), y para GluSph-d5 (m/z 467.3>287.4), LysoGb3-d7 (m/z 793.3>289.4) y LysoSM-d7 (m/z 472.4>184.0) como IS.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS SECCIÓN II: RELATIVOS AL MÉTODO LC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DE GLUCER Y GALCER EN LCR HUMANO

3.3.1. Muestras humanas y ética.

Se recogieron muestras de LCR de la Colección VHIP (*Vall d'Hebron Initiative for Parkinson*) del VHIR, incluyendo: 6 controles sanos (CS), 22 pacientes con EP idiopática sin variantes en *GBA1* (EPi) y 5 pacientes con EP asociada a variantes en *GBA1* (EP-GBA).

La punción lumbar para la obtención de LCR se realizó en el espacio L4, entre las 8:00 y las 10:00 de la mañana, con el objetivo de minimizar las posibles fluctuaciones circadianas. El LCR se recogió en tubos de polipropileno y se procesó siguiendo las recomendaciones internacionales [241]. Se obtuvieron entre 10 y 14 mL de muestra, que fueron centrifugados a 2000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. En las dos primeras horas tras la extracción, las muestras se dividieron en alícuotas de 0,5 mL en criotubos de polipropileno, y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

La clasificación de la severidad de la variante se basó en el estudio previo de Parlar et al. [54]. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Vall d'Hebron, con referencia PR(AG)170-2015, y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

3.3.2. Preparación de las soluciones WS(STD)_{LCR-HIL} y WS(IS)_{LCR-HIL}.

Para cada serie, se prepararon en fresco una WS(STD)_{LCR-HIL} y WS(IS)_{LCR-HIL} a partir de las respectivas soluciones intermedias. La WS(STD)_{LCR-HIL} contenía una mezcla de estándares GluCer C16:0, C18:0, C24:1 y GalCer C24:1 en matriz aLCR a una concentración de 2000 nM. El WS(IS)_{LCR-HIL}, que contenía GluCer C22:0-d4 y GalCer C22:0-d4, se preparó en MeCN a una concentración final de 170 nM. Las WS se prepararon de forma fresca para cada serie analítica y se utilizaron una única vez. La Figura 16 muestra un esquema representativo de la preparación de las distintas soluciones empleadas en este y en los demás métodos descritos en la tesis.

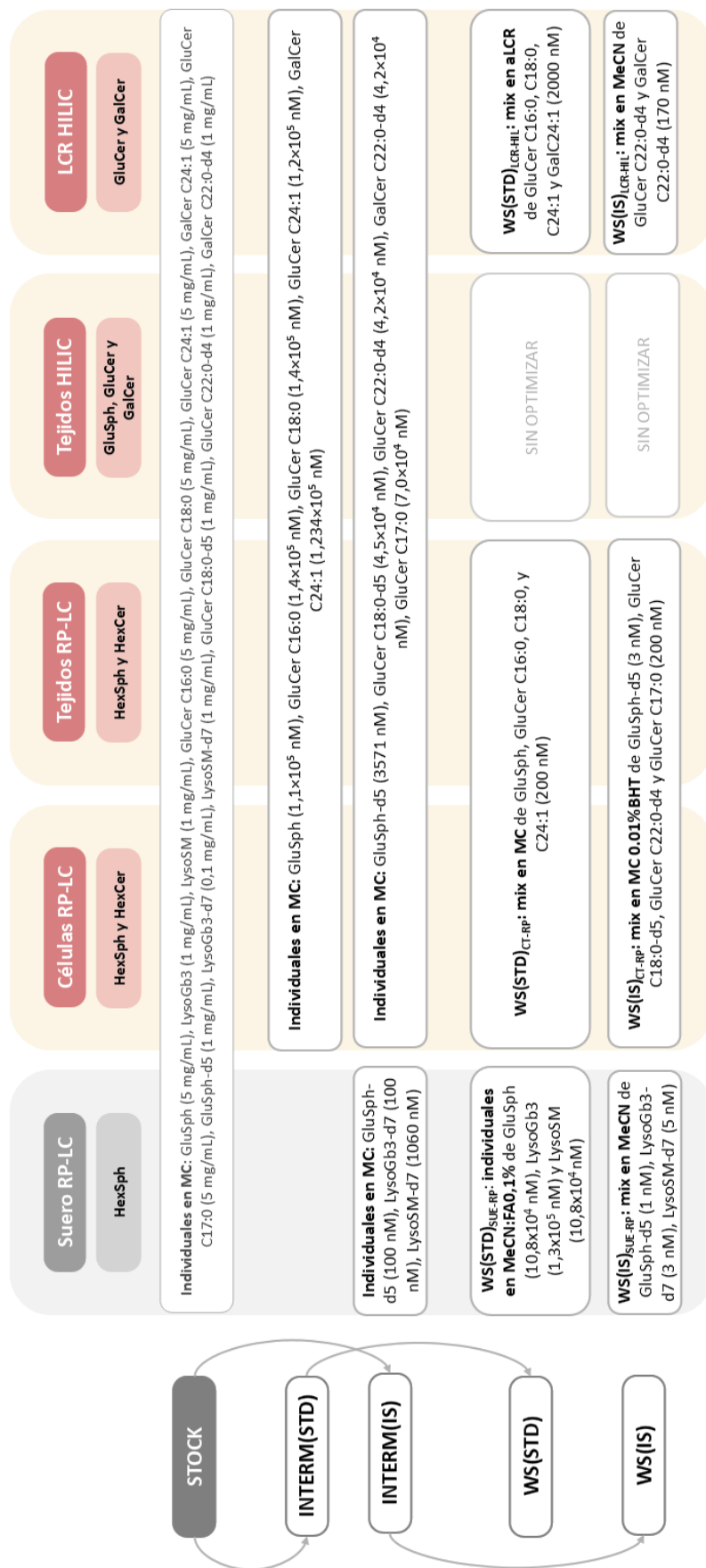


Figura 16. Esquema de preparación de soluciones necesarias para diferentes matrices y condiciones cromatográficas. En los métodos trabajados durante el desarrollo de esta tesis, se ha priorizado la armonización de soluciones con el fin de facilitar la implementación de protocolos en el contexto del estudio EP-GBA. MC: MeOH:CHCl₃, RP-LC: cromatografía líquida de fase reversa. HILIC: cromatografía líquida de interacción hidrofílica.

3.3.3. Preparación de las curvas de calibración y los controles de calidad internos.

Los intervalos de medida de las curvas se definieron a partir de ensayos piloto con muestras nativas, para cubrir adecuadamente las concentraciones endógenas observadas. A partir del $WS(STD)_{LCR-HIL}$ se prepararon siete concentraciones de estándar (200; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5 nM) en matriz subrogada aLCR mediante dilución seriada.

Además, se prepararon muestras de matriz blanco (matriz sin analito ni IS) y de matriz cero (matriz añadiendo únicamente IS).

Las muestras de QC interno se prepararon en matriz aLCR a partir de $WS(STD)_{LCR-HIL}$ a cuatro concentraciones para abarcar el intervalo de medida, LLQC (5 nM), LQC (20 nM), MQC (50 nM) y HQC (100 nM). Estas se emplearon para evaluar la calidad de cada serie analítica, así como la precisión y veracidad intra e interserie, su estabilidad a distintas condiciones de conservación, y el límite de cuantificación del método.

3.3.4. Evaluación analítica del método.

La evaluación se realizó según las recomendaciones sobre validación de métodos bioanalíticos de la CLSI [177,185] y la EMA [209].

3.3.4.1. Linealidad. Las curvas de calibración se generaron trazando la relación entre el área del pico de los estándares de calibración y el IS frente a las concentraciones nominales [185]. La veracidad de las concentraciones retrocalculadas se evaluó por su desviación porcentual de las concentraciones nominales, con una desviación aceptable fijada en $\pm 15\%$ de los valores predichos en al menos el 75% de los puntos [209].

La equivalencia de la matriz artificial (aLCR) y del LCR nativo (nLCR) se verificó comparando la variabilidad del cociente de áreas (CV, %) entre la matriz aLCR y dos matrices nLCR, a dos concentraciones (50 nM y 100 nM). En las matrices nativas se corrigió la presencia de compuestos endógenos.

3.3.4.2. Límite de blanco, límite de detección y límite de cuantificación. El límite de blanco (LoB) para cada isoforma se estimó a partir del percentil 95 de las mediciones de

muestra cero ($n=8$) en 3 días independientes. A partir de este valor, el límite de detección (LoD) se estimó como el LoB más 3 desviaciones estándar de los resultados de la muestra cero. El límite de cuantificación (LoQ) se determinó basándose en los criterios de precisión y veracidad ($<20\%$) [209] mediante el procesamiento de 5 réplicas del LLQC en dos series analíticas independientes, asegurando además una señal ruido (S/N) $>10:1$.

3.3.4.3. Precisión y veracidad. Para evaluar la precisión y la exactitud, se prepararon cinco réplicas independientes de LQC, MQC y HQC en fresco, y se analizaron en tres días distintos. La precisión se expresó como el coeficiente de variación (CV, %) de las réplicas y la veracidad se calculó como la desviación porcentual respecto a la concentración nominal dentro de cada serie y entre las tres series. El criterio de aceptación se estableció en $\leq 15\%$.

3.3.4.4. Selectividad. Se emplearon diferentes estrategias para evaluar la selectividad. Para la identificación del analito se compararon los TR entre los calibradores estándar y las muestras de LCR dentro de la misma serie. Para verificar la ausencia de interferencias de la matriz en la señal de cualquiera de las transiciones m/z , se inyectó una muestra blanco en cada serie. Además, puesto que todos los compuestos compartían el mismo ion producto, y en algunos casos los picos se solapaban, se incluyó al final de cada ciclo de scan una transición ficticia, o *dummy*, que compartía el mismo ion producto (m/z 600 $>$ 264.3) para el análisis de posible interferencia cruzada de MS [196]. Una respuesta aceptable se definió como ausente o $<20\%$ del área del analito y del $<5\%$ del área del IS en la muestra LLQC. Por último, se inyectaron soluciones individuales de cada estándar e IS a 200 nM y se evaluó la contribución de cada estándar a la respuesta de las transiciones restantes.

3.3.4.5. Estabilidad de los analitos en la muestra. Se analizaron alícuotas duplicadas de HQC almacenadas en distintas condiciones: tras 24 horas a 25 °C, 48 horas a 4 °C, 14 días a -20 °C, 2 meses a -80 °C y tras un ciclo de congelación-descongelación. Los resultados se ajustaron frente a los obtenidos para los QC de cada serie analítica, con el fin de reducir la influencia de la variación interdiaria, y se estimó la desviación respecto a la

concentración nominal. Asimismo, se verificó la estabilidad en el automuestreador mediante la reinyección de las muestras de control al finalizar cada serie.

3.3.4.6. Arrastre. Para evaluar el arrastre, se realizaron inyecciones alternas del patrón de concentración más alta (200 nM) y muestras de blanco, tres veces de forma consecutiva. La señal observada en la muestra de blanco tras la inyección del estándar concentrado no debía superar el 20% del LoQ ni el 5% de la señal del IS.

3.3.5. Efecto matriz, eficiencia de recuperación y eficiencia del proceso.

Aunque el estudio del efecto matriz, la eficiencia de la recuperación y la eficiencia del proceso forman parte de la evaluación analítica del método, en esta tesis se presenta en un apartado independiente debido al diseño experimental. La evaluación se realizó en tres lotes diferentes de matriz LCR nativo, obtenidos del grupo CS, cada uno a dos concentraciones finales de analito (50 y 100 nM, correspondientes a los niveles MQC y HQC del método) con una concentración fija de IS (30 nM). Para el estudio, se prepararon tres grupos de muestras (sets) para cada uno de los lotes de matriz y concentración evaluados, siguiendo el enfoque de Matuszewski et al. [213].

3.3.5.1. Preparación de las soluciones de trabajo. La Figura 17 ilustra la preparación de las soluciones de trabajo $WS(STD)_{ME}$, $WS(IS)_{ME}$, $Sol1_{ME}$ y $Sol2_{ME}$ utilizadas para obtener los tres sets.

La $WS(STD)_{ME}$ estaba compuesta por GluCer C16:0, C18:0 y C24:1 a 2000 nM, y la $WS(IS)_{ME}$, por GluCer C22:0-d4 a la misma concentración; ambas se utilizaron para la preparación de los sets 1 y 2. Para el set 3, se utilizaron las dos $Sol1_{ME}$ y $Sol2_{ME}$, con una mezcla de estos mismos estándares de GluCer, a 800 y 1600 nM, respectivamente, y del IS (GluCer C22:0-d4), a concentración fija de 480 nM.

Las soluciones intermedias y las WS correspondientes a este diseño experimental se prepararon frescas y no se conservaron.

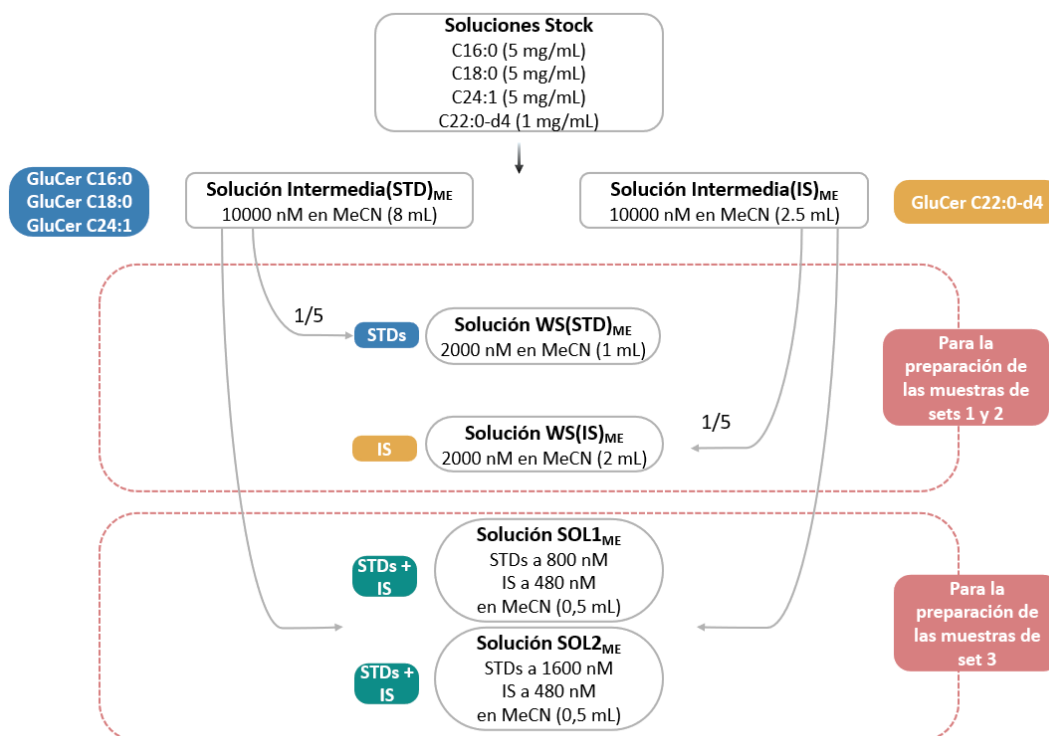


Figura 17. Esquema de la preparación de las diferentes soluciones utilizadas para los sets experimentales del estudio de efecto matriz. Creada con <https://BioRender.com>.

3.3.5.2. Preparación de los sets de muestras. A partir de las soluciones WS(STD)_{ME}, WS(IS)_{ME}, Sol1_{ME} y Sol2_{ME}, se prepararon los tres sets de muestras para cada lote de matriz, incluyendo en cada lote las dos concentraciones de estándar y una correspondiente muestra de blanco para restar la señal endógena basal. La Figura 18 muestra de forma esquemática el protocolo seguido para la obtención de los sets, que se detalla a continuación.

Set 1. El set 1 se preparó añadiendo diferentes volúmenes de WS(STD)_{ME} y un volumen fijo de WS(IS)_{ME} a la fase móvil B del método, por triplicado, para obtener las concentraciones finales de estándar seleccionados (50 y 100 nM). Por ello, en total, se prepararon siete muestras (3 lotes x 2 concentraciones estándar, más 1 muestra de blanco, compuesta únicamente por fase móvil). Una vez mezcladas, las soluciones se transfirieron a viales de cromatografía para su análisis.

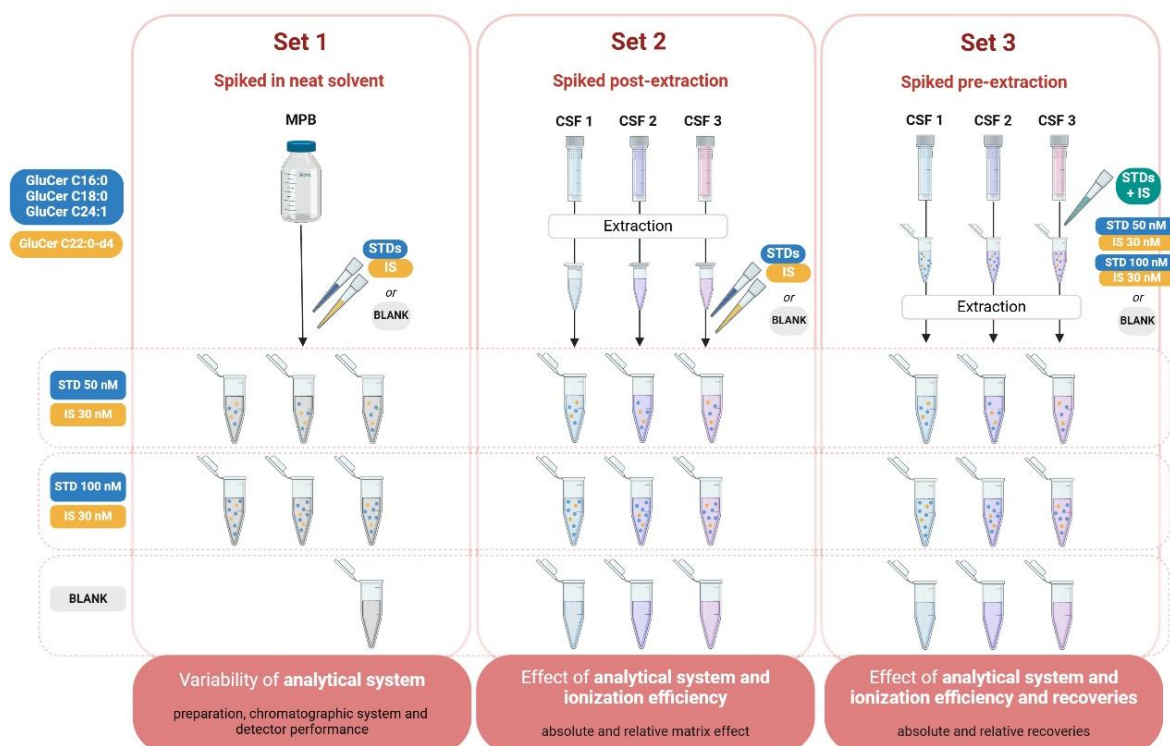


Figura 18. Esquema del protocolo para la preparación de los tres sets de muestras. Adaptado del enfoque de Matuszewski et al. [213]. MBP: Fase móvil B, CSF: líquido cefalorraquídeo. Creada con <https://BioRender.com>.

Set 2. Previamente a la preparación del set 2, es necesario obtener los extractos de matriz de cada uno de los lotes individuales, para ello, cada lote se sometió al pretratamiento desarrollado para este método (descrito en el subapartado 5.1.1). Brevemente, se añadieron 80 μL de muestra de LCR a tubos de plástico de 1,5 mL que contenían 15 μL de MeCN, en lugar del $\text{WS}(\text{IS})_{\text{LCR-HIL}}$, y se aplicó un proceso de extracción LLE en dos pasos utilizando $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (1:2, v/v). Las fases orgánicas obtenidas se combinaron, evaporaron bajo N_2 y se reconstituyeron en fase móvil B. El set 2 se preparó añadiendo diferentes volúmenes de $\text{WS}(\text{STD})_{\text{ME}}$ y un volumen fijo de $\text{WS}(\text{IS})_{\text{ME}}$ a cada extracto de matriz correspondiente para obtener las concentraciones estándar finales seleccionadas (50 y 100 nM). Además, se preparó una matriz en blanco para cada lote añadiendo MeCN a los extractos correspondientes en lugar de $\text{WS}(\text{STD})_{\text{ME}}$ y $\text{WS}(\text{IS})_{\text{ME}}$. En total se prepararon nueve muestras (3 x 3), que se transfirieron a viales cromatográficos para su inyección.

Set 3. El set 3 se preparó añadiendo las Sol1_{ME} y Sol2_{ME} a los mismos tres lotes de matriz empleados en el set anterior, esta vez antes de la extracción, para obtener concentraciones finales de 50 y 100 nM, respectivamente. Para cada lote, se preparó también una muestra blanco a la que se añadió MeCN en lugar de las Sol1_{ME} o Sol2_{ME}. Así, se prepararon nueve muestras (3 x 3) que se sometieron a extracción, siguiendo el mismo pretratamiento descrito para el set 2, y los extractos reconstituidos se transfirieron a viales de cromatografía para su análisis.

El orden de las inyecciones se detalla en la Tabla 9. La misma serie fue reinyectada para monitorizar la estabilidad de la señal a lo largo del tiempo.

Tabla 9. Orden de las inyecciones en el automuestreador en la serie analítica para el estudio del efecto matriz.

Set	Concentración (nM)	Lote de matriz	ID
1	0 (Blanco)	Fase móvil	S1 FM BLANCO
	50	Fase móvil	S1 FM1 50
		Fase móvil	S1 FM2 50
		Fase móvil	S1 FM3 50
		Fase móvil	S1 FM1 100
	100	Fase móvil	S1 FM2 100
		Fase móvil	S1 FM3 100
Vial de lavado (FM)			
2	0 (Blanco)	LCR 1	S2 L1 BLANCO
		LCR 2	S2 L2 BLANCO
		LCR 3	S2 L3 BLANCO
	50	LCR 1	S2 L1 50
		LCR 2	S2 L2 50
		LCR 3	S2 L3 50
	100	LCR 1	S2 L1 100
		LCR 2	S2 L2 100
		LCR 3	S2 L3 100
Vial de lavado (FM)			
3	0 (Blanco)	LCR 1	S3 L1 BLANCO
		LCR 2	S3 L2 BLANCO
		LCR 3	S3 L3 BLANCO
	50	LCR 1	S3 L1 50
		LCR 2	S3 L2 50
		LCR 3	S3 L3 50
	100	LCR 1	S3 L1 100
		LCR 2	S3 L2 100
		LCR 3	S3 L3 100

3.3.5.3. Cálculos aplicados para su evaluación. A partir de las áreas obtenidas de cada compuesto tras la inyección de la serie analítica, se aplicaron diversos cálculos para evaluar el efecto matriz, recuperación y eficiencia del proceso, conforme a las directrices de las principales guías internacionales [177,185,209,210,242] y publicaciones previas [213,234]. Por claridad expositiva, los cálculos se presentan estructurados en tres estrategias; éstas son el resultado del flujo de trabajo diseñado para su integración, descrito en el capítulo 6.

Primera estrategia. Se calcularon los CV (%) de las áreas absolutas y de las áreas ratio estándar/IS entre lotes de matriz, en cada set y para cada concentración. Además, se analizaron las relaciones entre las respuestas del estándar y del IS mediante diagramas de dispersión. Además, para cada lote de matriz se estimaron las pendientes de las curvas construidas con las áreas ratio a las concentraciones seleccionadas, y su variación entre lotes se expresó como precisión (CVs), siguiendo el enfoque descrito por Matuszewski et al. [234].

Segunda estrategia. Este enfoque se adaptó a partir de trabajos previos [234,243], utilizando las pendientes del set 3 obtenidas en la primera estrategia. Se calcularon las concentraciones a partir de las áreas ratio de un lote, tomando como referencia la curva correspondiente al lote con mayor diferencia en la pendiente. De ellas, se estimó la desviación porcentual respecto a los valores nominales en cada concentración, siguiendo la recomendación de la EMA [209].

Tercera estrategia. Para cada analito, se calcularon el efecto matriz absoluto (ME), la recuperación (RE) y la eficiencia global del proceso (PE) a partir de las medias de las áreas obtenidas en cada set, según las ecuaciones descritas previamente [177,213]:

$$ME (\%) = \frac{\text{Media del área en set 2}}{\text{Media del área en set 1}} \times 100$$

$$RE (\%) = \frac{\text{Media del área en set 3}}{\text{Media del área en set 2}} \times 100$$

$$PE (\%) = \frac{\text{Media del área en set 3}}{\text{Media del área en set 1}} \times 100$$

La posible relación entre los valores de ME y RE para cada compuestos y concentración se analizó mediante diagramas de dispersión. Además, se calcularon los factores de efecto matriz (MEF), de recuperación (REF) y de eficiencia del proceso (PEF), normalizando los valores de ME, RE y PE obtenidos para cada estándar frente a los correspondientes del IS:

$$MEF = \frac{\text{media de ME (\%)} \text{ en el analito}}{\text{media de ME (\%)} \text{ en el IS}}$$

$$REF = \frac{\text{media de RE (\%)} \text{ en el analito}}{\text{media de RE (\%)} \text{ en el IS}}$$

$$PEF = \frac{\text{media de PE (\%)} \text{ en el analito}}{\text{media de PE (\%)} \text{ en el IS}}$$

Por otro lado, el efecto matriz relativo (rME), la recuperación relativa (rRE) y la eficiencia relativa del proceso (rPE) se expresaron como CV (%) a partir de la comparación de los valores de ME, RE y PE entre diferentes lotes de matriz para cada analito e IS. Del mismo modo, también se calcularon los valores relativos de MEF (rMEF), REF (rREF) y PEF (rPEF).

3.3.5.4. Herramienta Excel. Los cálculos y diagramas de dispersión descritos se realizaron mediante una plantilla Microsoft Excel, desarrollada en el marco de esta tesis, y presentada, junto con los resultados obtenidos al aplicarla, en el capítulo 6.

3.3.5.5. Criterios de aceptación. En este estudio, se consideró que el método presentaba un rendimiento analítico adecuado cuando el CV y sesgo fue inferior al 15%, de acuerdo con las recomendaciones de las guías [185,209], indicando una compensación efectiva por parte del IS a lo largo del proceso.

3.3.6. Cuantificación de isoformas de GluCer y GalCer en LCR humano.

El análisis de las muestras de LCR de la cohorte del estudio se realizó en una sola serie. Se aplicó el mismo pretratamiento y análisis LC-MS/MS a todas las muestras, curvas y QC, como se ha descrito previamente.

3.3.7. Estadística.

Para el análisis de medianas en la evaluación de la estabilidad y en el análisis de las muestras, se emplearon pruebas no paramétricas Mann-Whitney y Kruskal-Wallis con el programa GraphPad Prism (v8), considerando $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Durante la validación del método, los valores atípicos se identificaron mediante el test de Grubbs y solo se eliminaron cuando se detectó un sesgo sistemático en todos los estándares, permitiendo un máximo de un replicado por serie analítica, asumiendo que dichos valores se debían a errores de pipeteo durante la preparación del QC. En los gráficos de dispersión del estudio del efecto matriz se realizó un test de correlación de Pearson.

Resultados

Sección I

El capítulo incluido en esta Sección I presenta los resultados obtenidos en el desarrollo secuencial de métodos para la cuantificación de GSL en matrices biológicas de modelos preclínicos (apartados 4.1 y 4.2), así como los resultados de su aplicación en estudios de investigación básica y traslacional (apartado 4.3), y está vinculado al primer objetivo específico de la tesis.

4

Resultados Sección I: Métodos LC-MS/MS para la cuantificación de GSL en modelos preclínicos

4.1. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HEXCER Y HEXSPH EN PELLET CELULAR Y TEJIDO MURINO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA

4.1.1. Optimización del protocolo de pretratamiento para pellets celulares.

Para abordar la cuantificación de GSL en modelos celulares *in vitro*, se llevó a cabo una optimización del pretratamiento de la muestra basada en la metodología descrita por Gorrochategui et al. [244]. Con este objetivo, se compararon distintas condiciones experimentales, incluyendo distintos volúmenes y proporciones de los solventes de extracción y reconstitución, el tipo de sonicación, y los tiempos de agitación. Entre las estrategias evaluadas, la sonicación del pellet celular mediante sonda, seguida de una extracción LLE con MeOH:CHCl₃ (1:2, v/v), mostró ser la opción más reproducible y con mayor rendimiento.

En concreto, los pellets celulares se resuspendieron en 600 µL del WS(IS)_{CT-RP} en tubos tipo eppendorf, se agitaron con vórtex durante 30 segundos y se dejaron en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se sometieron a sonicación por sonda en dos ciclos de 15 pulsos. Tras este paso, se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante se transfirió a tubos de vidrio, evitando el pellet, se evaporó con nitrógeno, y se reconstituyó en 500 µL de MeOH:CHCl₃ (1:2, v/v).

4.1.2. Optimización del protocolo de pretratamiento para tejido de ratón.

El método fue adaptado posteriormente para su aplicación en tejido de modelos animales, optimizando el pretratamiento. Para ello, se incorporó una etapa de homogeneización previa a la extracción LLE con MeOH:CHCl₃ (1:2, v/v), en la cual se ajustó el volumen de agua en función del peso del tejido y se estableció el número de ciclos necesarios para su disgregación.

El protocolo resultante consistió en la homogeneización de los tejidos congelados en agua desionizada utilizando un homogeneizador tipo Dounce de borosilicato con doble pistón (15+15 golpes). En el caso del tejido cerebral, se estableció de forma consistente un volumen de 600 μL de agua; para otros tejidos de mayor tamaño y variabilidad, como el hígado, se aplicó una proporción ajustada de 30 μL de agua por mg de tejido. En determinadas muestras fue necesario emplear homogeneizadores manuales de sobremesa de mayor capacidad. El volumen utilizado en esta etapa se requiere aplicar posteriormente como factor de corrección en el cálculo de las concentraciones.

Un esquema gráfico de los diferentes protocolos resultantes para el pretratamiento de muestras de modelos preclínicos se presenta en la Figura 19.

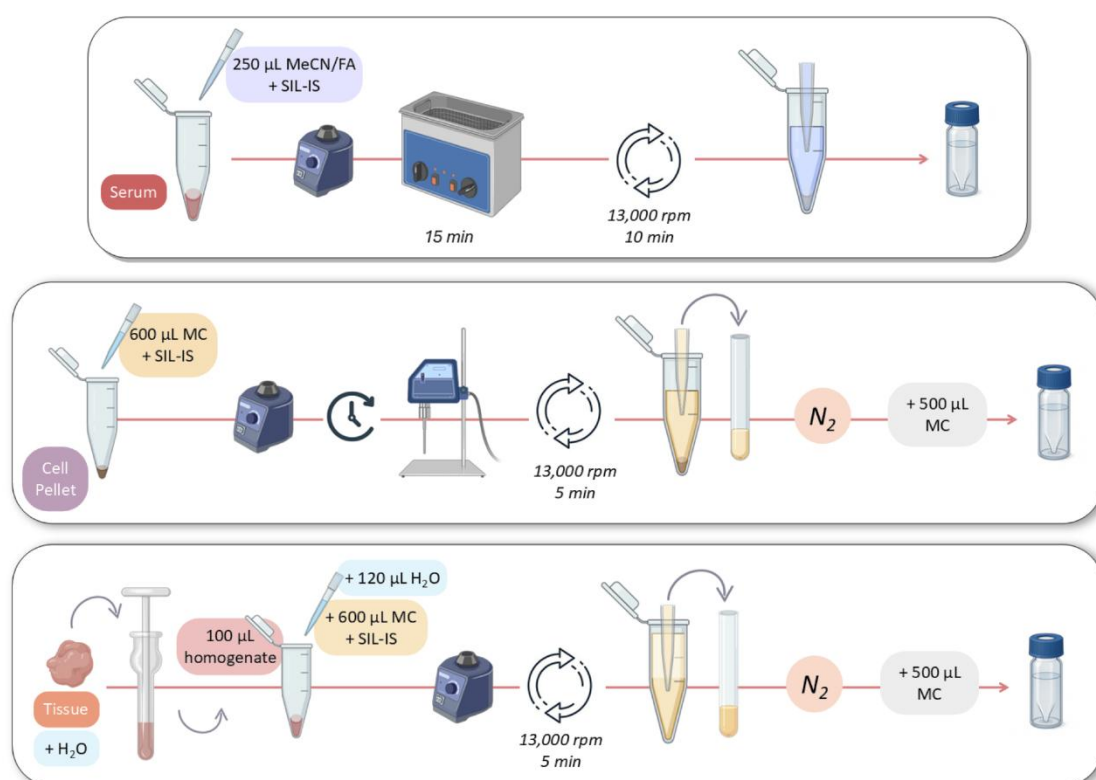


Figura 19. Esquema gráfico del procedimiento de extracción lipídica en diferentes matrices biológicas utilizadas en estudios preclínicos. Se representa el pretratamiento para suero (para lisoesfingolípidos), pellets celulares y tejido (para HexSph y HexCer).

Los esfingolípidos se extrajeron a partir de un protocolo adaptado de Basit et al. [202]. Se evaluaron distintas condiciones experimentales para maximizar el rendimiento de extracción y la reproducibilidad de las áreas. Estas pruebas incluyeron la comparación

entre diferentes volúmenes y composiciones de los solventes de extracción, el número de repeticiones de la extracción LLE, así como distintos tratamientos aplicados a los extractos obtenidos (comparando entre su inyección directa o su evaporación y reconstitución posterior). Además, se probaron diferentes tipos y tiempos de agitación durante la mezcla del homogeneizado con el solvente de extracción, incluyendo vórtex y sonicación mediante ultrasonidos. El procedimiento optimizado consistió en la transferencia de 100 μL del homogeneizado a tubos eppendorf que contenían 120 μL de H_2O y 600 μL de $\text{WS}(\text{IS})_{\text{CT-RP}}$. Las muestras se vorteaban durante 30 segundos y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. A continuación, se recuperaron 350 μL de la fase orgánica, que se transfirieron a tubos de vidrio, se evaporaron bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyeron en 500 μL de $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (1:2, v/v). Finalmente, se transfirieron 200 μL a viales para el análisis cromatográfico.

4.1.3. Optimización de los parámetros del detector MS y de las condiciones cromatográficas en fase reversa.

Como punto de partida, se utilizaron las condiciones cromatográficas y del detector de MS previamente validadas para la cuantificación de lisoefingolípidos en suero humano (descrito en subapartado 3.2.3.). A partir de ahí, se amplió el perfil analítico con la incorporación de isoformas de ácido graso de HexCer, lo que requirió la optimización de los parámetros del detector y de las condiciones cromatográficas mediante soluciones concentradas de mezclas de estándares. Se ajustaron las masas y los voltajes para cada estándar disponible. El ion producto seleccionado representaba el ion fragmento principal, generado a través de la pérdida neutra de la cadena acilo, glucosa (o galactosa) y una molécula de H_2O , y correspondiente al fragmento de la fracción de esfingosina (m/z 264), tal como se describe en las bases de datos de lipidómica [192] y anteriormente [79,171]. En aquellas especies sin estándar comercial, se asignaron las masas según su peso molecular, utilizando los mismos decimales y condiciones que los de sus análogos estructurales más próximos. Finalmente, se optimizaron distintos parámetros de la fuente de ionización mediante la monitorización continua de la transición con menor intensidad de respuesta.

En paralelo, se ajustaron las condiciones cromatográficas tras evaluar distintas composiciones y gradientes de fase móvil. La fase móvil B se modificó, sustituyendo MeCN por una mezcla de IPA y MeCN, y se optimizó el gradiente para aumentar la proporción de fase B al inicio y al final del análisis; estos ajustes permitieron adelantar la elución de los lisoesfingolípidos, más polares, al primer minuto, y lograr una separación de las isoformas de HexCer en función de la longitud de su cadena, dentro de un tiempo total de análisis de 8 minutos (Figura 20).

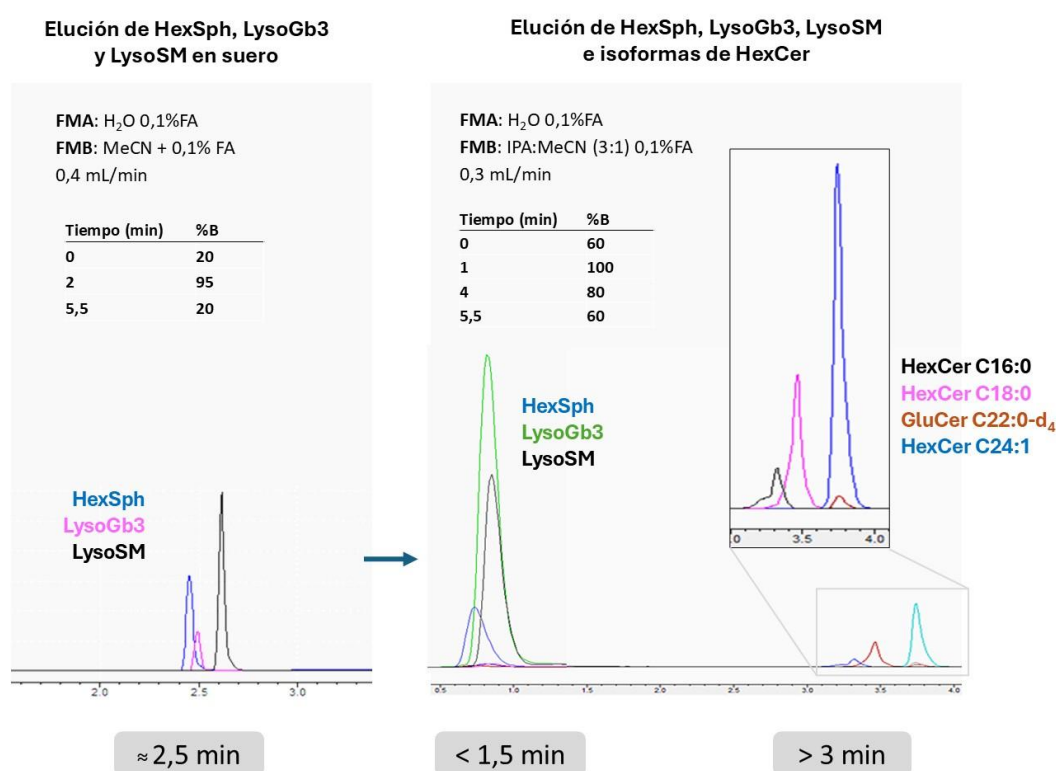


Figura 20. Optimización de la cromatografía en fase reversa. A partir del método de lisoesfingolípidos en suero humano (izquierda), se optimizaron las condiciones cromatográficas para incluir las isoformas de HexCer dentro del perfil (derecha).

Se inyectaron 3 µL de cada muestra, calibrador o control en el sistema cromatográfico con una columna de fase reversa (Teknokroma, TR-10902) y gradiente binario consistente en fase móvil A con H₂O con 0,1% FA y fase móvil B con IPA:MeCN (3:1, 0,1% FA). El MS operó en modo de ionización por ESI(+).

La Tabla 10 recoge los parámetros cromatográficos y del detector MS optimizados. Estos parámetros son comunes para cuantificar pellets celulares y tejido. Se muestra un cromatograma de tejido como ejemplo en la Figura 21.

Tabla 10. Parámetros optimizados de HPLC (RP-LC) y MS/MS para la cuantificación de isoformas de HexSph y HexCer en pellets celulares y tejidos para estudios preclínicos.

Columna	Teknokroma Mediterranea Sea18 1,8 µm 2x50mm					
Temp. columna	35°C					
Fase móvil A	H2O 0,1%FA					
Fase móvil B	IPA:MeCN (3:1 v/v) 0,1%FA					
Solvente de lavado	IPA:MeCN (60:40)					
Gradiente	Tiempo (min)		%B			
	0		60			
	1 a 4,2		100			
	4,2 a 5,5		80			
	5,5 a 7		60			
Flujo (mL/min)	0,3					
Vol. de inyección (µL)	3					
Tiempo de análisis (min)	7					
Temp. automuestreador (°C)	10					

Analito	Transición MRM (m/z)	Q1 (V)	CE (eV)	Q3 (V)	TR (min)	Fuente	
HexSph	462.3 > 282.2	-18	-22	-20	0,81	Modo de ionización	ESI +
GluSph-d5	467.3 > 287.2	-18	-22	-20	0,82	Flujo de gas nebulizador (L/min)	2,5
HexCer C16:0	700.6 > 264.3	-26	-35	-19	3,45	Flujo de gas de secado (L/min)	5
HexCer C18:0	728.6 > 264.3	-26	-36	-19	3,60	Flujo de gas de calentamiento (L/min)	15
HexCer C20:0	756.7 > 264.3	-26	-36	-19	3,85	Temp. interfase (°C)	300
HexCer C22:0	784.7 > 264.3	-30	-38	-19	3,93	Temp. línea de desolvatación (°C)	200
HexCer C23:0	798.7 > 264.3	-30	-38	-19	4,05	Temp. bloque calefactor (°C)	500
HexCer C24:0	812.7 > 264.3	-30	-40	-19	4,14		
HexCer C24:1	810.7 > 264.3	-30	-40	-19	3,91		
GluCer C18-d5 (IS)	733.6 > 269.3	-26	-36	-19	3,62	Tiempo adquisición /	15
GluCer C22-d4 (IS)	788.7 > 264.3	-30	-38	-19	3,94	dwell time (ms)	
GluCer C17 (IS)*	714.6 > 264.3	-26	-35	-19	3,52		

*IS en estudio, no disponible al inicio del desarrollo

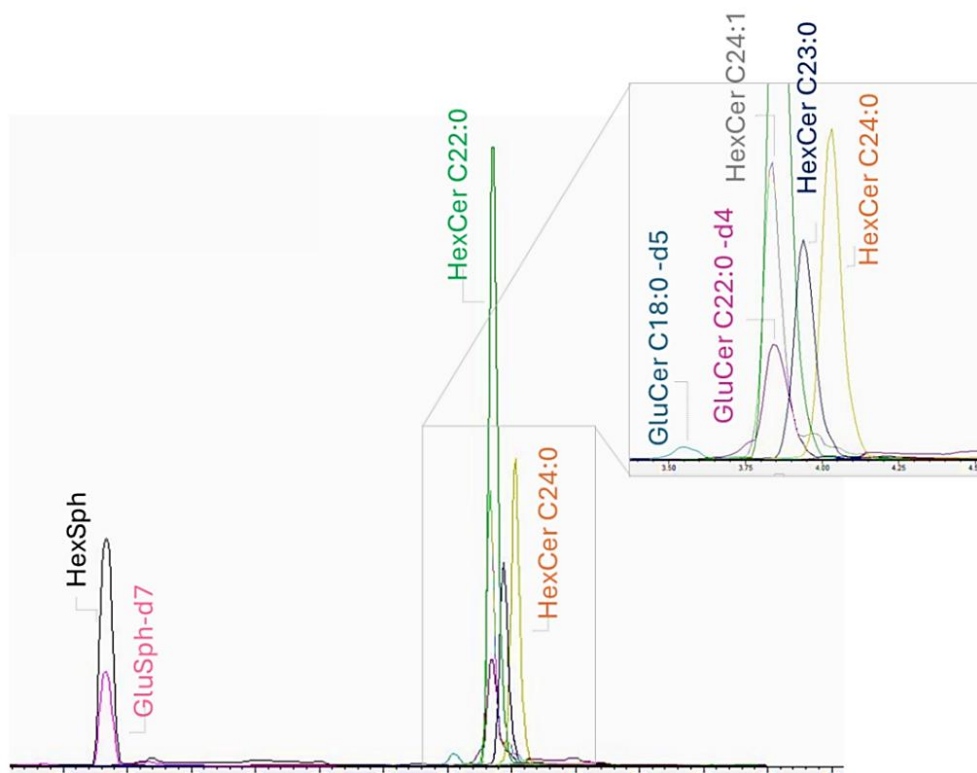


Figura 21. Cromatograma representativo de una muestra de tejido cerebral murino analizada por RP-LC-MS/MS. HexSph y su IS eluyen en primer lugar, seguidos de las isoformas de HexCer en orden creciente de longitud de cadena.

HexSph y las isoformas GluCer C16:0, C18:0 y C24:1 se cuantificaron con sus respectivas curvas de calibración; las isoformas GluCer C22:0, C23:0 y C24:0 se semicuantificaron empleando las curvas de calibración de GluCer C16:0, C18:0 y C24:1, respectivamente.

4.1.4. Curva de calibración y controles de calidad internos.

Se optimizó una única curva de calibración para la cuantificación de esfingolípidos en pellets celulares y tejido cerebral, con un intervalo de medida que abarcara las concentraciones esperadas de HexCer y HexSph en ambas matrices y en los diferentes grupos experimentales. Los siete puntos de concentración seleccionados, preparados en MeOH:CHCl₃ tal y como se describe en el subapartado 3.2.2.3., se transfirieron a tubos de vidrio para su evaporación directa, generando una curva final con un rango de 100 a 0,0125 pmol.

Los QC internos se procesaron de forma análoga a las muestras. Para el análisis de una serie analítica de pellets celulares, se añadieron 600 μL de $\text{WS}(\text{IS})_{\text{CT-RP}}$, se agitaron con vórtex, se centrifugaron, y se transfirieron los sobrenadantes, sin arrastrar pellet, a tubos de vidrio.

Para análisis de tejido, se incorporaron 200 μL de agua, seguidos de 600 μL de $\text{WS}(\text{IS})_{\text{CT-RP}}$. Tras vortear y centrifugar, se recuperaron las fases orgánicas, que se transfirieron a tubos de vidrio.

En los tubos de vidrio, todas las muestras, incluidas los QC y los estándares de la curva, se evaporaron completamente bajo nitrógeno. Posteriormente, se reconstituyeron con 500 μL de $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ y se transfirieron 200 μL a viales de cromatografía para su análisis.

4.1.5. Normalización de los resultados.

La estrategia de normalización se ajustó a lo largo del proceso. Inicialmente se utilizó el peso del tejido, pero posteriormente se adoptó la cuantificación de proteínas a partir del homogenado restante, al comprobarse que el contenido proteico proporcionaba una medida más precisa de la cantidad de tejido analizado.

4.1.6. Monitorización analítica.

Los resultados que se presentan a continuación deben considerarse exclusivamente como una monitorización interna del método y no constituyen una validación formal conforme a guías bioanalíticas internacionales.

En la Tabla 11 se presentan la concentración promedio retrocalculada, la imprecisión (CV, %) y la desviación respecto al valor nominal (sesgo, %) para cada estándar de las curvas analizadas en 12 series independientes.

Tabla 11. Desviación respecto a la concentración nominal (sesgo, %) y variabilidad (CV, %) interserie de las concentraciones retrocalculadas de las curvas de calibración (n=12), para cada analito, obtenidas en el período entre 2021 y 2025.

Conc. nominal (pmol)	HexSph			HexCer C16:0		
	Media (pmol)	CV (%)	Sesgo (%)	Media (pmol)	CV (%)	Sesgo (%)
0,0125	0,0063	15,3	-50,0	0,0150	56,6	20,0
0,0275	0,0277	14,1	0,8	0,0203	71,8	-26,1
0,06	0,01	14,4	-14,4	0,07	14,4	20,2
0,4	0,40	14,7	4,9	0,40	16,5	0,3
4,5	4,7	8,6	5,5	4,7	8,0	3,7
35	35,1	9,6	0,4	34,7	13,5	-0,8
100	98,8	3,0	-1,2	97,2	6,0	-2,6

Conc. nominal (pmol)	HexCer C18:0			HexCer C24:1		
	Media (pmol)	CV (%)	Sesgo (%)	Media (pmol)	CV (%)	Sesgo (%)
0,0125	0,0140	50,5	12,0	0,0156	76,2	24,8
0,0275	0,0192	49,1	-30,3	0,0250	66,1	-9,1
0,06	0,07	26,8	13,6	0,08	27,2	27,9
0,4	0,41	18,7	2,6	0,39	17,0	-1,9
4,5	4,7	10,6	5,0	4,7	8,7	5,1
35	35,6	8,5	1,7	35,9	11,3	2,5
100	100	3,3	0,0	98,4	3,2	-1,6

Para HexSph, la imprecisión fue inferior al 15% en todas las concentraciones analizadas y el sesgo se mantuvo por debajo del 15% a partir de 0,0275 pmol. Con los datos obtenidos, se propuso establecer preliminarmente la concentración de 0,0275 pmol como el LoQ para este analito. En el caso de las isoformas de HexCer, las concentraciones inferiores a 0,06 pmol mostraron una imprecisión y/o un sesgo elevados (>20%). A concentraciones superiores, correspondientes a los primeros cuatro puntos de la curva, se presentaron resultados consistentes, con imprecisiones inferiores al 15% y el sesgo comprendido en $\pm 5\%$, lo que indica una adecuada capacidad de ajuste del método en ese intervalo de medida.

Tabla 12. Imprecisión de los QC internos y resumen de los factores de normalización interserie.

	HexSph	HexCer C16:0	HexCer C18:0	HexCer C24:1
QC1 CV (%)	12,3	15,4	16,9	13,5
QC2 CV (%)	12,0	7,8	11,0	11,1
Factor	1,0 (0,0)	0,3 (0,3-0,4)	1,6 (1,1-2,2)	0,7 (0,5-1,0)

Los datos del factor se expresan como mediana (rango intercuartílico). QC1: 5pmol, QC2:10 pmol.

En la Tabla 12 se presentan los resultados obtenidos para los QC internos analizados en las 12 series independientes. La imprecisión interserie osciló entre el 7,8% y el 16,9%, siendo inferior al 12% en el QC2, de concentración más alta. La evaluación de los factores de normalización aplicados entre series mostró una respuesta analítica más estable para HexSph y más variable para las isoformas.

4.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS HILIC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCER Y GALCER EN TEJIDO CEREBRAL DE RATÓN

Al abordar el estudio de muestras de tejido cerebral, la separación cromatográfica de GalCer adquirió especial relevancia, dado que se presenta en concentraciones superiores a las de GluCer. Para resolver la coelución de estos isómeros estructurales se implementó cromatografía HILIC y se optimizaron las condiciones experimentales. Los TR se confirmaron con estándares específicos de GalCer (Figura 22).

Basado en las publicaciones de Hamler et al. [79] y Boutin et al. [171], en los que se proponían métodos independientes para la cuantificación de GluCer y GluSph, se planteó un protocolo en gradiente unificado que permitiera la detección simultánea de ambas familias lipídicas en un único cromatograma.

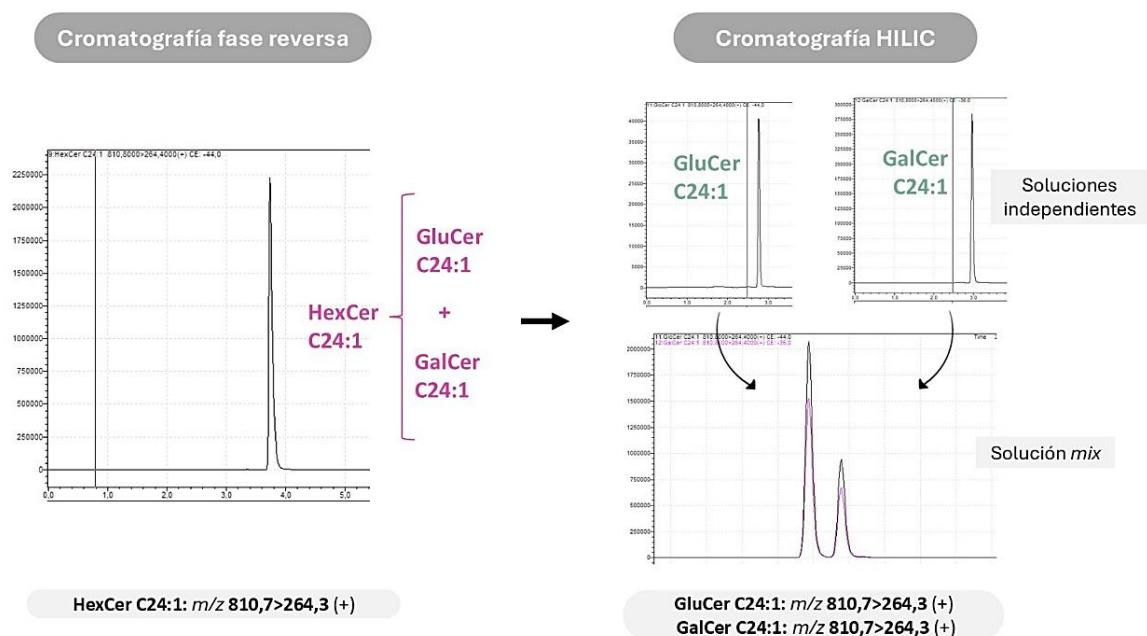


Figura 22. Separación cromatográfica de las isoformas GluCer C24:1 y GalCer C24:1 (m/z 810.7>264.3) mediante fase reversa y HILIC. En cromatografía en fase reversa (izquierda), ambas isoformas coeluyen (HexCer C24:1). Con cromatografía HILIC (derecha) ambos isómeros presentan tiempos de elución diferentes.

Se prepararon la fase móvil A (orgánica), compuesta por MeCN:MeOH:H₂O:FA (95:2,5:2,5:0,5) con 5 mM de formiato amónico, y la fase móvil B (acuosa), compuesta por MeCN:MeOH:H₂O:FA (5:47,5:47,5:0,5) con 5 mM de formiato amónico. Se evaluaron

variantes del gradiente cromatográfico ajustando el inicio del aumento de la fase móvil B. Partiendo de una condición empírica, retrasar dicho inicio prolongó la elución de los lisoesfingolípidos; mientras que adelantarlo, y fijarlo sobre el minuto 2, redujo el tiempo de elución entre ambos grupos ($\approx 1,5$ min). A continuación se compararon gradientes escalonados y rampas lineales para optimizar la resolución entre isómeros (Figura 23A). Bajo las condiciones representadas en la Figura 23B se obtuvo la mejor separación de las isoformas, incluyendo la elución de los lisoesfingolípidos en el mismo cromatograma. GluSph fue ser cuantificable, aunque con una pérdida significativa de señal respecto al método basado en RP-LC.

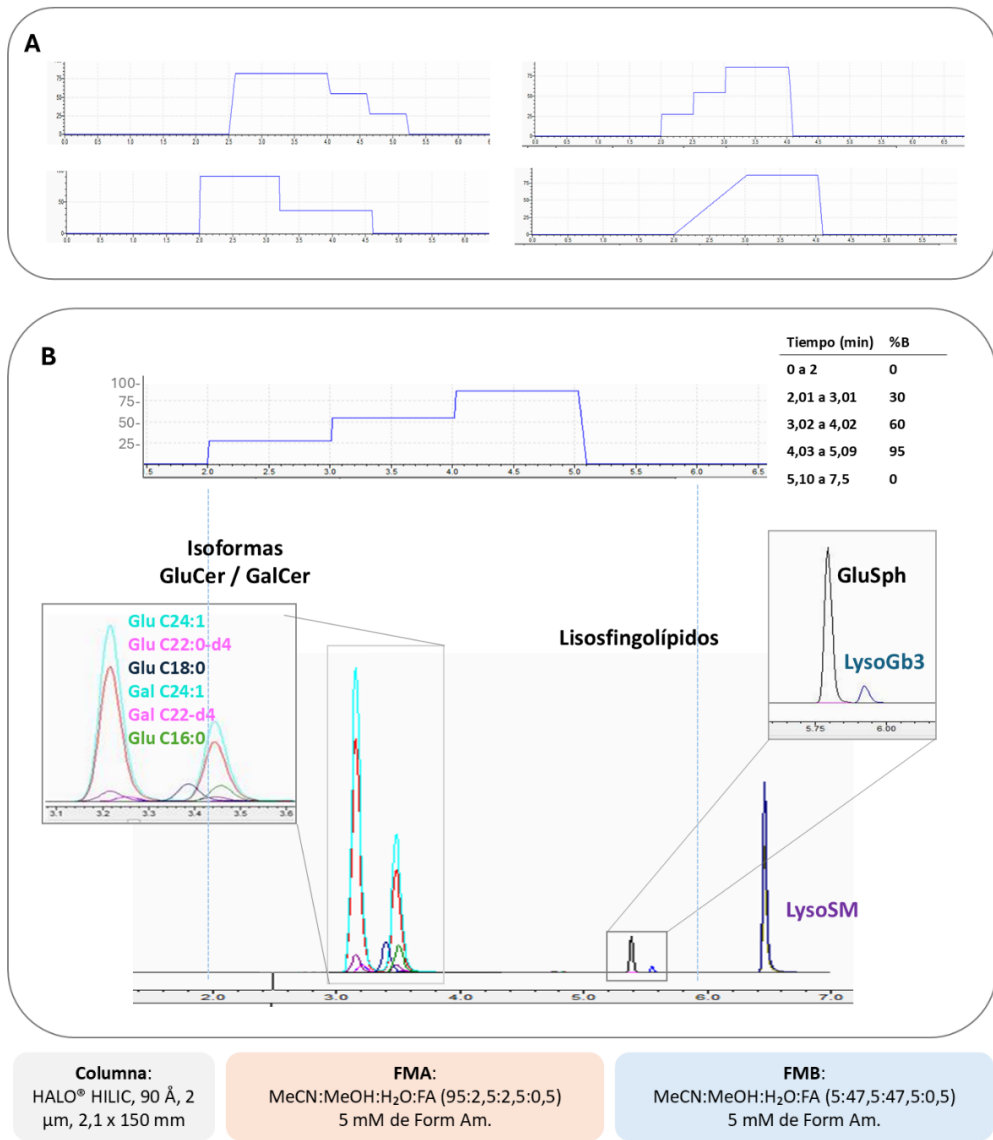


Figura 23. Optimización del gradiente en HILIC para la separación de GluCer/GalCer y lisoesfingolípidos. A) Esquema de gradientes evaluados durante la optimización (%B). B) Gradiente seleccionado (%B) y cromatograma representativo de elución de un WS de los estándares de las isoformas GluCer/GalCer y de GluSph, LysoGb3 y LysoSM a 200nM.

Aunque la cromatografía se desarrolló para la cuantificación en tejido, se mantuvo el procesamiento de las muestras con el método basado en RP-LC para asegurar la continuidad con estudios previos. La optimización completa del método LC-MS/MS basado en cromatografía HILIC se centró en la cuantificación de las isoformas de GluCer y GalCer en matriz LCR humana, con el objetivo de generar resultados aplicables a estudios clínicos de la cohorte VHIP.

Un resumen comparativo de los métodos descritos en este capítulo se presenta en la Tabla 13.

.

Tabla 13. Resumen de las características de los métodos LC-MS/MS desarrollados para cuantificar muestras preclínicas.

Descriptivo	Lisoefingolipidos en suero de ratón	HexSph y HexCer en pellet celular	HexSph y HexCer en tejido de ratón	GluCer y GluSph en tejido cerebral de ratón
Matriz	Suero	Células	Tejido periférico	Tejido cerebral
Especies	Hexosil(β)esfingosina (d18:1), Globotriaosilesfingosina (d18:1)*, Esfingosilfosforilcolina (d18:1)*	Hexosil(β)esfingosina (d18:1), C16 Hexosil(β)ceramida (d18:1/16:0), C18 Hexosil(β)ceramida (d18:1/18:0), C20 Hexosil(β)ceramida (d18:1/20:0), C22 Hexosil(β)ceramida (d18:1/22:0), C23 Hexosil(β)ceramida (d18:1/23:0), C24:1 Hexosil(β)ceramida (d18:1/24:1(15Z)), C24 Hexosil(β)ceramida (d18:1/24:0)	Hexosil(β)esfingosina (d18:1), C16 Hexosil(β)ceramida (d18:1/16:0), C18 Hexosil(β)ceramida (d18:1/18:0), C20 Hexosil(β)ceramida (d18:1/20:0), C22 Glucosil(β)ceramida (d18:1/22:0), C23 Glucosil(β)ceramida (d18:1/23:0), C24:1 Glucosil(β)ceramida (d18:1/24:1(15Z)), C24 Glucosil(β)ceramida (d18:1/24:0), Galactosil(β)esfingosina (d18:1), C16 Galactosil(β)ceramida (d18:1/16:0), C18 Galactosil(β)ceramida (d18:1/18:0), C20 Galactosil(β)ceramida (d18:1/20:0), C22 Galactosil(β)ceramida (d18:1/22:0), C23 Galactosil(β)ceramida (d18:1/23:0), C24:1 Galactosil(β)ceramida (d18:1/24:1(15Z)), C24 Galactosil(β)ceramida (d18:1/24:0)	
Estándar interno	GluSph-d5, , LGb3-d7*, LSM-d7*	GluSph-d5, GluCer C18-d5, GluCer C22-d4		GluSph-d5, GluCer C18-d5, GluCer C22-d4

* Aunque estos estándares e IS están incluidos en las curvas preparadas para este método, sólo se utilizan para la cuantificación asistencial de muestras de pacientes en el laboratorio de Metabolopatías.

Tabla 13. Resumen de las características de los métodos LC-MS/MS desarrollados para cuantificar muestras preclínicas.

Descriptivo	Lisoefingolipidos en suero de ratón	HexSph y HexCer en pellet celular	HexSph y HexCer en tejido de ratón	GluCer y GluSph en tejido cerebral de ratón
Cromatografía	RP-LC C18 FMA: H2O/FA 0.1% FMB: MeCN/FA 0.1% Rinse: FMB	RP-LC C18 FMA: H2O/FA 0.1% FMB: IPA:MeCN (3:1) 0.1% FA Rinse: FMB		HILIC FMA: MeCN:MeOH: H2O:FA (95:2.5:2.5:0.5) 5mM form amon FMB: MeCN: MeOH:H2O:FA (5:47.5:47.5:0.5) 5mM form amon Rinse: IPA
Pretratamiento de las muestras	Sonicar en baño ultrasónicos con WIS. Precipitación directa -> sobrenadante.	Sonicar pellet con sonda. LLE MeOH:CHCl ₃ (1:2) -> sobrenadante. Evaporación N ₂ Reconstit en MeOH:CHCl ₃ (1:2)	Homogenización en agua con Dounce. LLE MeOH:CHCl ₃ (1:2) y agua -> fase orgánica. Evaporación N ₂ Reconstit en MeOH:CHCl ₃ (1:2)	Homogenización en agua con Dounce. LLE MeOH:CHCl ₃ (1:2) -> fase orgánica. Evaporación N ₂ Reconstit en FMA
Matriz de la Curva	Pool de suero deplecionado con carbón activo	MeOH:CHCl ₃		Sin definir.
Rango de la curva	0,125-400 nM	0,0125-100 pmol		Sin definir.
Pretratamiento de la curva	Mismo que muestras	Mismo que muestras (final): Evaporación directa N ₂ Reconstit en MeOH:CHCl ₃ (1:2)		Sin definir.
Estado del método	Validado analíticamente. Evaluación mensual mediante programa europeo de calidad externo (ERNDIM). Hexsph: verac. 98%; prec. interensayo 7%	Desarrollado. Falta de validación analítica exhaustiva (podría requerir revisión y reajuste de protocolos).		En fase de optimización.

4.3. APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS LC-MS/MS CON CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA EN MODELOS PRECLÍNICOS

Se analizaron las muestras recogidas en la Tabla 14 en el marco de distintos objetivos experimentales, que abarcan desde estudios *in vitro* e *in vivo* de evaluación de eficacia terapéutica hasta la caracterización de modelos preclínicos y el desarrollo de investigación básica sobre los mecanismos patogénicos de *GBA1*.

Tabla 14. Resumen de las muestras procesadas.

Método*	Tipo de muestra	n	Área
I	Suero ratón	347	Traslacional
II	Líneas celulares	46	Básica
II	Líneas celulares	255	Traslacional
III	Tejido ratón (Hígado, bazo, cerebro)	344	Traslacional

* I: Lisoefingolípidos en suero de ratón; II: HexSph y HexCer en pellet celular; III: HexSph y HexCer en tejido de ratón, resumidos en la Tabla 13.

Los resultados obtenidos en las distintas series experimentales han contribuido al conocimiento que sustenta esta línea de investigación y, durante este período, han dado lugar a la presentación de varios pósters en congresos (Anexo) y a dos publicaciones científicas en colaboración [78,121]. Estos estudios ejemplifican la aplicabilidad de los métodos desarrollados en distintos modelos y matrices. A continuación, se resumen los principales hallazgos publicados.

4.3.1. Caracterización de un modelo celular con déficit de β -GCasa.

El estudio de Navarro et al. [78], en el marco de investigación básica, proporciona una explicación mecanicista de cómo la deficiencia de β -GCasa contribuye a la alteración lisosomal, especialmente de la CMA, y como resultado favorece la acumulación de α -sinucleína. Este estudio fue evaluado en la línea celular BE(2)-M17, con variantes en *GBA1* KO, N370S y L444P. La disminución de la actividad de β -GCasa se asoció con un incremento en los niveles de HexCer y HexSph (Figura 24). La línea *GBA1* KO mostró una

acumulación drástica de HexCer y HexSph. Sin embargo, las líneas celulares mutantes para N370S y L444P presentaron concentraciones similares a las líneas *GBA1* WT, salvo por un leve aumento de HexSph en *GBA1* L444P. En el compartimento lisosomal, se observaron tendencias similares, con un mayor enriquecimiento de esfingolípidos en las distintas líneas celulares, sugiriendo que la acumulación es más evidenciante de forma local.

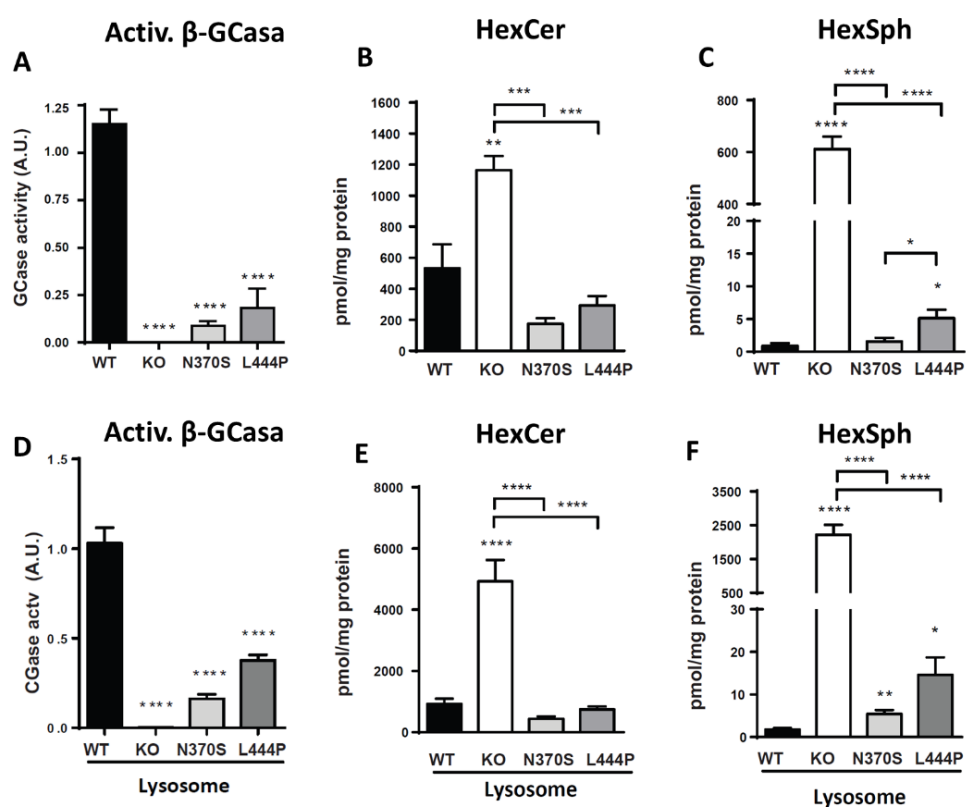


Figura 24. La pérdida de actividad β -GCasa conlleva la acumulación de HexCer y HexSph en el modelo celular BE(2)-M17 *in vitro*. **A)** Actividad β -GCasa en el homogenado celular. Cuantificación de **B)** HexCer y **C)** HexSph en homogenado celular. **D)** Actividad β -GCasa en fracción lisosomal. Cuantificación de **E)** HexCer y **F)** HexSph en fracción lisosomal. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Adaptado de Navarro et al. [78].

4.3.2. Caracterización de un modelo murino con déficit de β -GCasa.

El modelo murino *Gba1* D409V KI fue caracterizado antes de su uso en los proyectos traslacionales relacionados con evaluación de eficacia terapéutica (subapartados 4.3.3. y 4.3.4.).

Para la caracterización basal del modelo animal, se analizaron, entre otros, la actividad enzimática de β -GCasa en muestras de mesencéfalo ventral (VMB) de animales WT, heterocigotos y homocigotos para la variante en *Gba1* D409V (Figura 25A). Los ratones HZ y HO presentaron una clara disminución de la actividad de β -GCasa en el VMB.

También se evaluó la concentración de HexSph, tanto en muestras de VMB (Figura 25B) como de suero (Figura 25C). En ambos casos, los animales HO presentaron una acumulación significativa de HexSph.

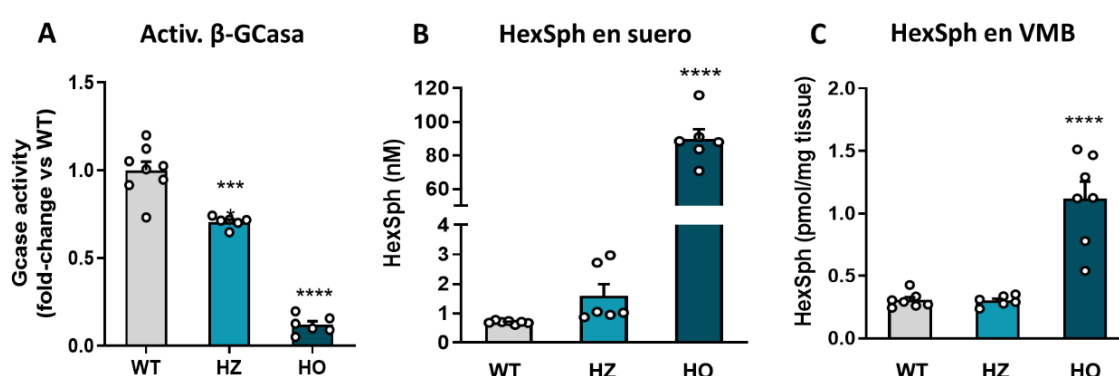


Figura 25. Caracterización del modelo murino *Gba1* D409V KI. A) Ensayo de actividad enzimática β -GCasa en el mesencéfalo ventral (VMB) de ratones *Gba1* D409V KI homocigotos (HO), heterocigotos (HZ) y controles (WT). Los resultados se expresan como cambio relativo respecto a los niveles de WT. Concentración de GluSph B) en el VMB y C) en suero de ratones *Gba1* D409V KI HO, HZ y WT. Los diagramas se presentan como media $\pm$ error estándar de la media. Se aplicó test ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Adaptado de la tesis doctoral de Marta Montpeyó García-Moreno (2024).

4.3.3. Evaluación de chaperonas alostéricas para *GBA1*.

Una segunda línea de investigación del Grupo de Enfermedades Neurodegenerativas del VHIR, en colaboración con la empresa farmacéutica *Gain Therapeutics*, tiene como objetivo diseñar y caracterizar nuevas chaperonas moleculares alostéricas y específicas de β -GCasa que puedan llegar al SNC para incrementar la actividad β -GCasa neuronal en el contexto de la EP. En este proyecto, la cuantificación de GSL en muestras biológicas ha sido uno de los principales *readouts* empleados para evaluar la eficacia terapéutica de las chaperonas. A través de estrategias de *drug discovery*, se identificaron compuestos candidatos, seleccionando el más eficaz en función de su capacidad para incrementar la actividad enzimática y reducir la concentración de HexCer y HexSph en

fibroblastos de pacientes con EG (L444P/L444P). Este compuesto fue posteriormente validado *in vitro* en el modelo celular BE(2)-M17 (*GBA1* WT, N370S y L444P), demostrando una reducción significativa de HexSph en células mutantes (Figura 26) y una mejora en la viabilidad celular [121].

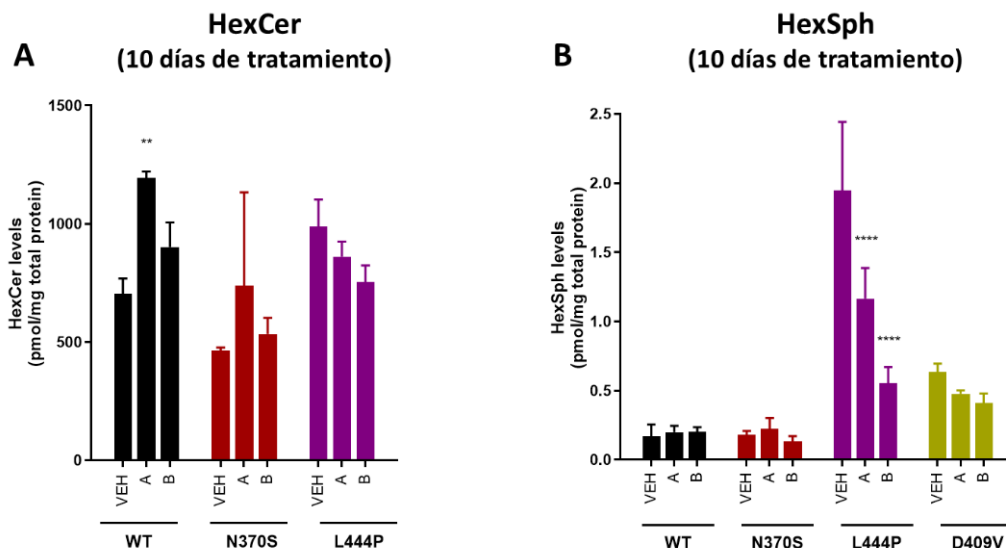


Figura 26. Concentración de HexSph y HexCer en células BE(2)M17 tras el tratamiento con chaperonas A y B. Resultados de la cuantificación de A) HexCer y B) HexSph, en las cuatro líneas neuronales (WT, N370S, L444P y D409V) tras 10 días de tratamiento con las chaperonas seleccionadas A y B a 25 μ M. El control es el tratamiento con solución vehicular (VEH). Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar de experimentos independientes. Se aplicó test ANOVA de dos vías con prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Adaptada de la tesis doctoral de Marta Montpeyó García-Moreno (2024).

Además, las chaperonas seleccionadas durante el proceso de validación *in vitro* se evaluaron posteriormente *in vivo* en el modelo murino *Gba1* D409V KI, para estudiar la biodistribución y capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica mediante la cuantificación de la actividad enzimática y la reducción de los esfingolípidos acumulados en distintos tejidos, tanto del SNC como periféricos. En la Figura 27 se presentan los resultados del experimento en el que 16 ratones macho fueron tratados por vía oral, dos veces al día durante 12 días consecutivos, con suero salino, solución vehicular (VEH), o chaperona A. Veinticuatro horas después de la última dosis, se procedió a su eutanasia y disección, sin haberse observado signos de toxicidad. Aunque no se detectó un incremento en la actividad β -GCasa (A, D y G), se observaron reducciones en las concentraciones de ambos esfingolípidos en el VMB (B-C), hígado (E-F) y bazo (H-I).

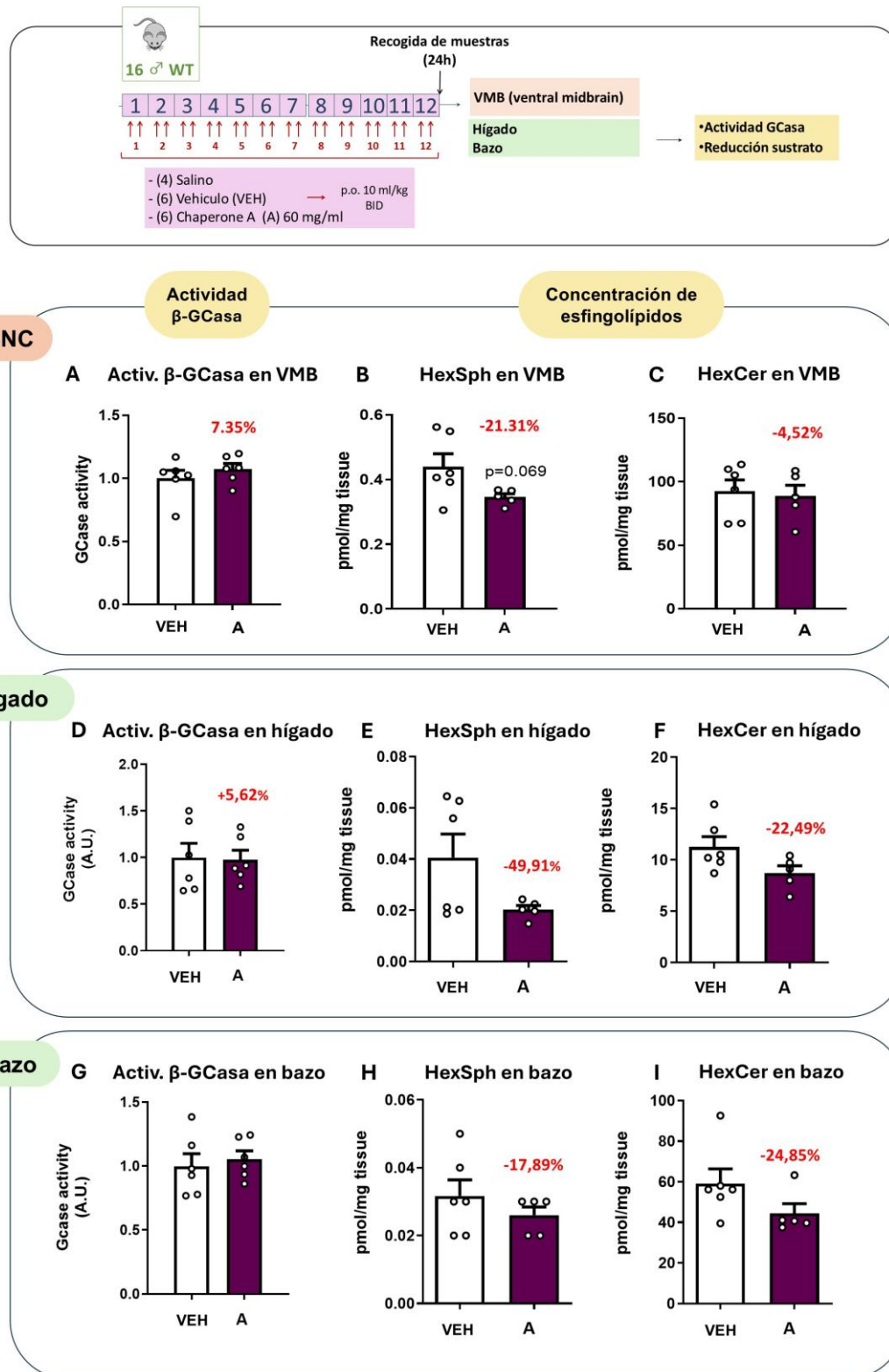


Figura 27. Efecto de la chaperona A *in vivo*. (A-C) Resultados de los ensayos de actividad enzimática de β-GCasa (izquierda) y de la cuantificación de esfingolípidos (derecha) realizados en mesencéfalo ventral (VMB) de animales tratados con vehículo (VEH) o chaperona A. (D-I) Resultados de los ensayos de actividad enzimática de β-GCasa (izquierda) y cuantificación de esfingolípidos (derecha) en órganos periféricos (hígado y bazo) de animales tratados con VEH o chaperona A. En todos los casos, los resultados se presentan como media ± desviación estándar. Se aplicó test t student no pareado. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001. Adaptada de la tesis doctoral de Marta Montpeyó García-Moreno (2024).

4.3.4. Evaluación de nanoconjugados para terapia de reemplazo enzimático (ERT).

Otra línea de investigación del Grupo de Enfermedades Neurodegenerativas del VHIR tiene como objetivo desarrollar nuevas formulaciones basadas en ERT con β -GCasa recombinante, denominada nanoGBA, con el fin de mejorar su estabilidad, distribución y eficacia terapéutica. La cuantificación de esfingolípidos con estos métodos ha permitido estudiar los efectos de dicho fármaco experimental en modelos *in vitro* y *in vivo*.

En la Figura 28 se presentan los resultados para la cuantificación de HexCer y HexSph *in vitro*, a los 1, 3 y 7 días tras tratamiento con nanoGBA. La acumulación total de HexCer y HexSph en la línea celular BE(2)-M17 KO fue elevada en comparación con las líneas WT y mutantes, por lo que el efecto de nanoGBA se evidenció como una reducción significativa de estos lípidos, siendo más pronunciado con el tiempo. En cambio, en las líneas WT y mutantes, donde el grado de acumulación es menor, el efecto de nanoGBA fue menos marcado.

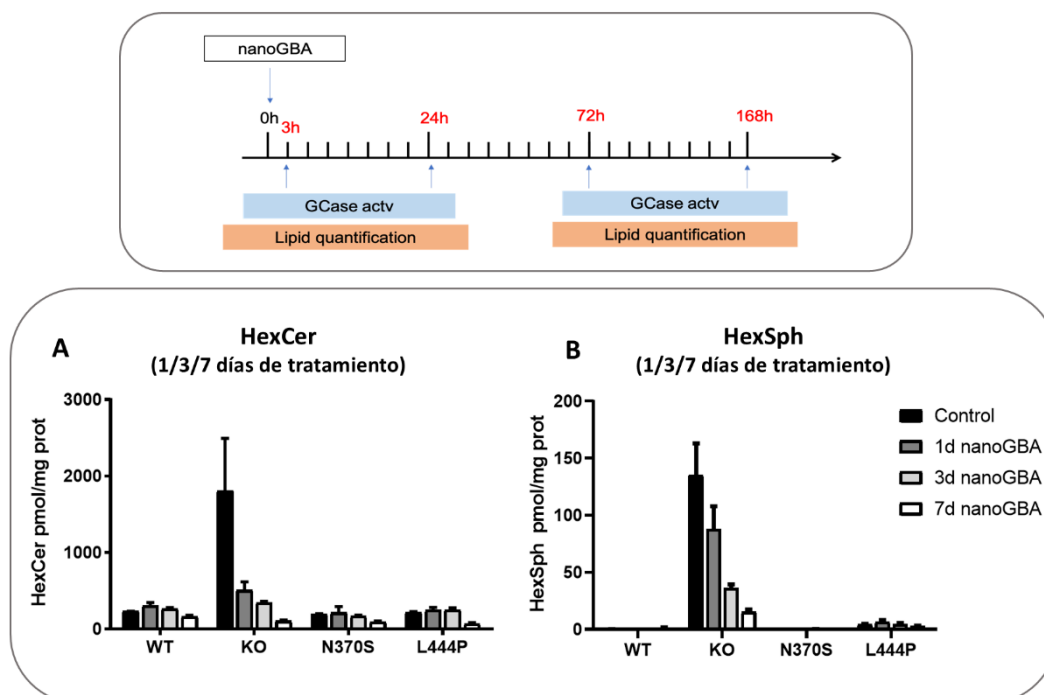


Figura 28. Concentración de esfingolípidos tras tratamiento con nanoGBA *in vitro*. A) HexCer y B) HexSph fueron cuantificadas tras 1, 3 y 7 días de tratamiento, en líneas celulares *GBA1* WT, KO, N370S y L444P, comparadas con líneas no tratadas control. Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar de la media de triplicados. Adaptada del trabajo de fin de máster de Pablo Castillo-Sánchez (2022).

In vivo, se llevó a cabo un estudio para comparar el comportamiento de nanoGBA con GBA (como ERT convencional) tras su administración intravenosa. No se detectaron aumentos de actividad β -GCasa a los 7 días con ninguno de los dos fármacos, pero el efecto global pudo evaluarse al cuantificar los niveles de HexSph en tejidos y suero. El tratamiento con nanoGBA redujo de forma más marcada la concentración de HexSph en hígado y bazo en comparación con GBA, lo que sugiere una mayor eficacia a largo plazo en órganos diana (Figura 29A-B). En suero, ambos tratamientos redujeron significativamente HexSph a los 1 y 3 días respecto a los ratones HO control; a los 7 días, solo el tratamiento con nanoGBA mantuvo una reducción significativa, reflejando una mayor duración del efecto sistémico que con ERT convencional (Figura 29C).

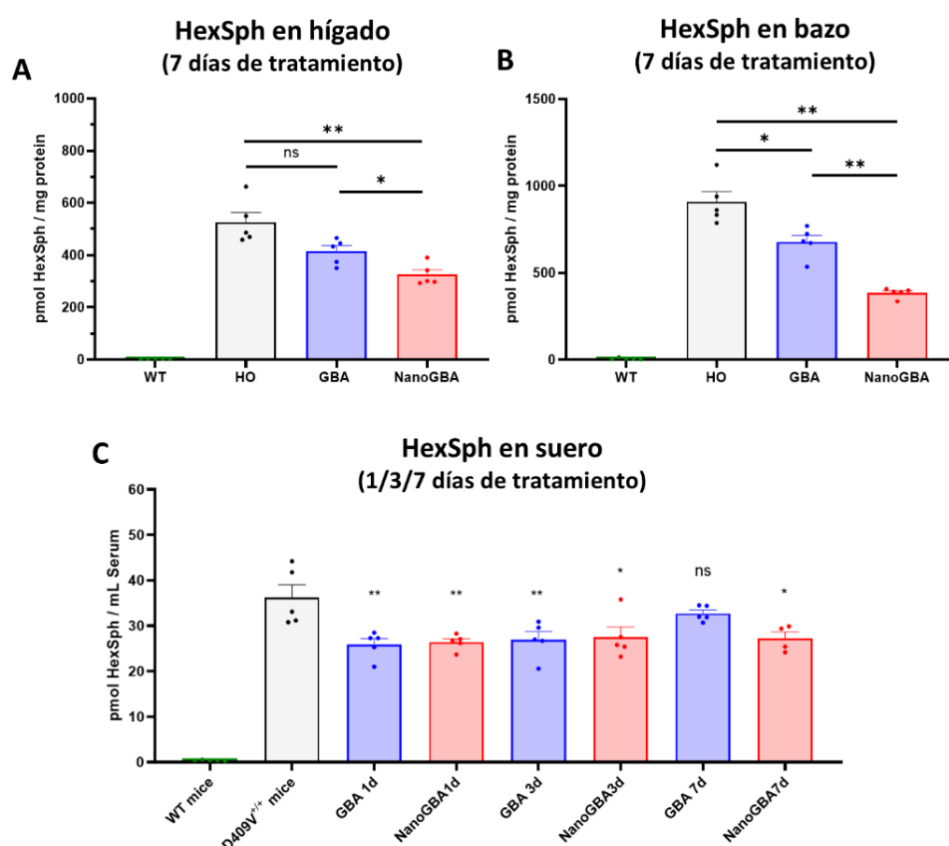


Figura 29. Evaluación del tratamiento nanoGBA *in vivo*. Los ratones GBA D409V KI HO fueron tratados por vía intravenosa con 25 μ g de GBA o de nanoGBA y sacrificados a los 1, 3 o 7 días tras la administración. Los ratones WT y D409V HO tratados con vehículo se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente. **A-B)** Cuantificación de HexSph en hígado y bazo una semana después de la administración de nanoGBA o de GBA. Se aplicó ANOVA, con comparaciones múltiples de Games-Howell. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. **C)** Cuantificación de HexSph en suero en los días 1, 3 y 7 después de la administración de nanoGBA o de GBA. Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Entre los grupos GBA y nanoGBA se aplicó ANOVA de dos factores con comparaciones múltiples de Tukey. Adaptada de la tesis doctoral de Eddi Pradas-Gracia (2025).

Resultados

Sección II

Los capítulos incluidos en esta Sección II presentan los resultados del desarrollo y evaluación del método LC-MS/MS para la cuantificación de GluCer y GalCer en LCR humano (capítulo 5), la integración de estrategias de evaluación del efecto matriz (capítulo 6) y la aplicación del método en estudios clínicos (capítulo 7). Estos capítulos están vinculados al segundo, tercer y cuarto objetivos específicos, respectivamente.

5

Resultados Sección II: Método LC-MS/MS para la cuantificación de isoformas de GluCer y GalCer en LCR humano

5.1. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCER Y GALCER EN LCR HUMANO

5.1.1. Pretratamiento de las muestras de LCR.

Se evaluaron distintas condiciones experimentales basadas en publicaciones previas [172,173,198,202], incluyendo la incubación en frío durante la extracción, el número de extracciones secuenciales por LLE y las proporciones de MeOH:CHCl₃ en ellas (2:1/2:1, 1:1/2:1, 1:1/1:1 y 3:1/2:1), la proporción de volumen solvente/muestra, o los tiempos de agitación. El protocolo optimizado consistió en añadir 80 µL de calibradores, QC o muestras de LCR a tubos eppendorf. Se incorporaron 15 µL de WS(IS)_{LCR-HIL} y 120 µL de agua desionizada, vorteoando tras cada adición. A continuación, se añadieron 600 µL de MeOH:CHCl₃ (1:2, v/v), y las muestras se agitaron en vórtex durante 2 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se recuperó la fase orgánica (inferior), que fue transferida a tubos de vidrio.

En un segundo paso, se añadieron 600 µL de MeOH:CHCl₃ (1:2, v/v) a la fase acuosa remanente, repitiendo la agitación y la centrifugación en las mismas condiciones. Ambas fases orgánicas resultantes se mezclaron, se evaporaron bajo nitrógeno, se reconstituyeron en 250 µL de fase móvil orgánica y se transfirieron a viales cromatográficos.

5.1.2. Optimización de los parámetros cromatográficos y del detector.

Las especies GluCer y GalCer se separaron utilizando una columna HALO HILIC 90A de 2,7 µm, 4,6x150 mm (Advanced Materials Technology, EE.UU.). Las fases móviles A y B consistieron en MeCN:MeOH:H₂O:FA (5:47,5:47,5:0,5) con 5 mM de formiato de amonio, y MeCN:MeOH:H₂O:FA (95:2,5:2,5:0,5) con 5 mM de formiato de amonio, respectivamente, con un gradiente binario, equivalente al método desarrollado en el apartado 4.2.. Sin embargo, los lisoesfingolípidos presentaron una señal indetectable en LCR, atribuible a su baja concentración en esta matriz. Por ello, se evaluó el rendimiento

Tabla 15. Parámetros optimizados de HPLC y MS/MS y transiciones MRM para la cuantificación de isoformas de GluCer y GalCer y sus correspondientes IS en muestras de LCR.

Columna	Halo HILIC 90A 2,7 µm, 4,6x150mm	Analito	TR (min)
Temp. columna	35°C	GluCer C16:0	3,322
Fase móvil A	MeCN:MeOH:H2O:FA (5:47,5:47,5:0,5) 5mM Formiato de amonio	GalCer C16:0	3,586
Fase móvil B	MeCN:MeOH: H2O:FA (95:2,5:2,5:0,5) 5mM Formiato de amonio	GluCer C18:0	3,268
Solvente de lavado	IPA	GalCer C18:0	3,506
		GluCer C20:0	3,187
Gradiente ^a	Tiempo (min) %B	GalCer C20:0	3,424
	0 a 2 100	GluCer C22:0	3,125
	2,01 a 3,01 70	GalCer C22:0	3,362
	3,02 a 4,02 40	GluCer C23:0	3,126
	4,03 a 5,09 5	GalCer C23:0	3,326
	5,10 a 7,5 100	GluCer C24:0	3,084
Flujo (mL/min)	0,7	GalCer C24:0	3,301
Vol. de inyección (µL)	10	GluCer C24:1	3,107
Tiempo de análisis (min)	7,5	GalCer C24:1	3,326
Temp. automuestreador (°C)	4	GluCer C22:0-d4 (IS)	3,125
		GalCer C22:0-d4 (IS)	3,362

Analito	Transición MRM (m/z)	Q1 (V)	CE (eV)	Q3 (V)	Fuente	
GluCer C16:0	700.6 > 264.3	-26	-35.0	-19	Modo de ionización	ESI +
GalCer C16:0	700.6 > 264.3	-26	-35.0	-19	Flujo de gas nebulizador (L/min)	3
GluCer C18:0	728.6 > 264.3	-26	-36.0	-19	Flujo de gas de calentamiento (L/min)	5
GalCer C18:0	728.6 > 264.3	-26	-36.0	-19	Flujo de gas de secado (L/min)	15
GluCer C20:0	756.7 > 264.3	-26	-36.0	-19	Temp. interfase (°C)	300
GalCer C20:0	756.7 > 264.3	-26	-36.0	-19	Temp. línea de desolvatación (°C)	150
GluCer C22:0	784.7 > 264.3	-30	-38.0	-19	Temp. bloque calefactor (°C)	500
GalCer C22:0	784.7 > 264.3	-30	-38.0	-19		
GluCer C23:0	798.7 > 264.3	-30	-38.0	-19		
GalCer C23:0	798.7 > 264.3	-30	-38.0	-19		
GluCer C24:0	812.7 > 264.3	-30	-40.0	-19		
GalCer C24:0	812.7 > 264.3	-30	-40.0	-19	Tiempo adquisición / dwell time (ms)	15
GluCer C24:1	810.7 > 264.3	-30	-40.0	-19		
GalCer C24:1	810.7 > 264.3	-30	-40.0	-19		
GluCer C22:0-d4 (IS)	788.7 > 264.3	-30	-38.0	-19		
GalCer C22:0-d4 (IS)	788.7 > 264.3	-30	-38.0	-19		

^a Los cambios en el % de B son inmediatos.

de una extracción independiente mediante precipitación directa, incluyendo también la incorporación de una etapa adicional de evaporación y reconstitución en un volumen mínimo de 30 µl de fase móvil orgánica, para concentrar los analitos. Esta modificación duplicó la señal obtenida de un estándar a 400 nM (áreas de 563.429 a 1.106.908) respecto a la precipitación directa clásica, pero no resultó suficiente para su inclusión en el análisis, dadas las concentraciones considerablemente más bajas previstas en LCR.

Ante esta limitación, se evaluó una elución isocrática para la separación de las isoformas que, al no mejorar la resolución de los analitos, fue descartada, también con el propósito de mantener una estrategia metodológica lo más homogénea posible entre matrices.

Las muestras se mantuvieron en el automuestreador a 4 °C y se inyectaron 10 µL. El analizador de masas operó en modo de ESI(+), y en modo de adquisición MRM.

El ion producto seleccionado representaba el ion fragmento principal, generado a través de la pérdida neutra de la cadena acilo, glucosa (o galactosa) y una molécula de H₂O, y correspondiente al fragmento de la fracción de esfingosina (m/z 264), tal como se describe en las bases de datos de lipidómica [192] y anteriormente [79,171]. Los detalles de las condiciones cromatográficas y del detector MS se resumen en la Tabla 15.

5.1.3. Curvas de calibración y controles de calidad internos.

La optimización resultó en el diseño de cuatro curvas de calibración en matriz subrogada (aLCR) con un intervalo de medida de 2,5 a 200 nM, cuya preparación se detalla en el subapartado 3.3.3.. Las curvas preparadas con estándares independientes y mediante dilución seriada fueron equivalentes, por lo que se optó por la segunda estrategia para reducir el volumen de matriz empleado. Las isoformas de GluCer se cuantificaron utilizando sus respectivas curvas de calibración, con excepción de las isoformas C22:0, C23:0 y C24:0, que fueron semicuantificadas empleando las curvas de C18:0 y C24:1, respectivamente. Para todas las isoformas de GluCer se utilizó GluCer C22:0-d4 como IS. Las isoformas de GalCer se semicuantificaron utilizando la curva de calibración de GalCer C24:1, empleando GalCer C22:0-d4 como IS.

Los estándares de calibración y los QC internos se procesaron de forma análoga a las muestras.

Se muestra un cromatograma representativo de un estándar de la curva en la Figura 30.

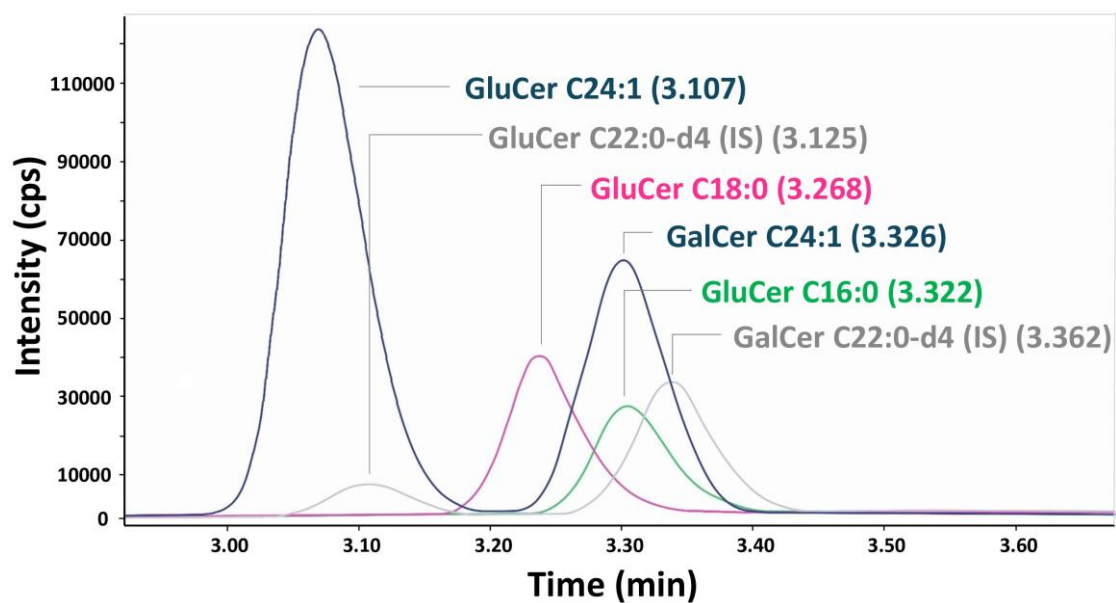


Figura 30. Cromatograma del estándar de 200 nM, en el que se indican los tiempos de retención de las isoformas de GluCer y GalCer.

5.2. EVALUACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCER Y GALCER EN LCR HUMANO

5.2.1. Separación cromatográfica

El método logró la elución de 14 analitos en LCR, 7 isoformas GluCer (C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C23:0, C24:1 y C24:0) y sus 7 isómeros estructurales GalCer, en una ventana de elución de 4 minutos y un análisis total de 8 minutos (Figura 32).

5.2.2. Linealidad de la curva.

Las curvas de calibración de siete puntos para cada una de las isoformas (GluCer C16:0, C18:0, C24:1 y GalCer C24:1) mostraron una respuesta lineal con ajuste ponderado 1/C y coeficientes de determinación (R^2) $\geq 0,995$ (Figura 31).

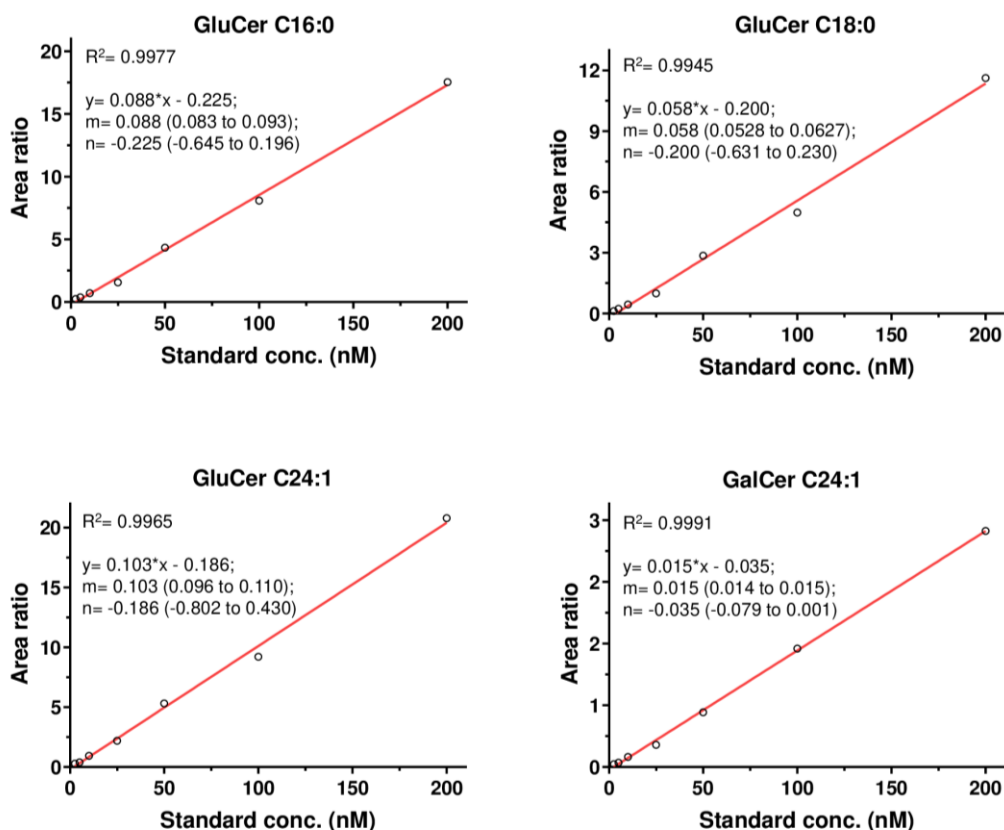


Figura 31. Linealidad de las curvas de calibración. El LLLI (límite inferior del intervalo de linealidad) se estableció en 2,5 nM, el LoQ (límite inferior de cuantificación) en 5 nM y el ULoQ (límite superior de cuantificación) en 200 nM. Se presentan los intervalos de confianza del 95 % (IC95 %) de las pendientes y las ordenadas al origen obtenidas mediante regresión lineal.

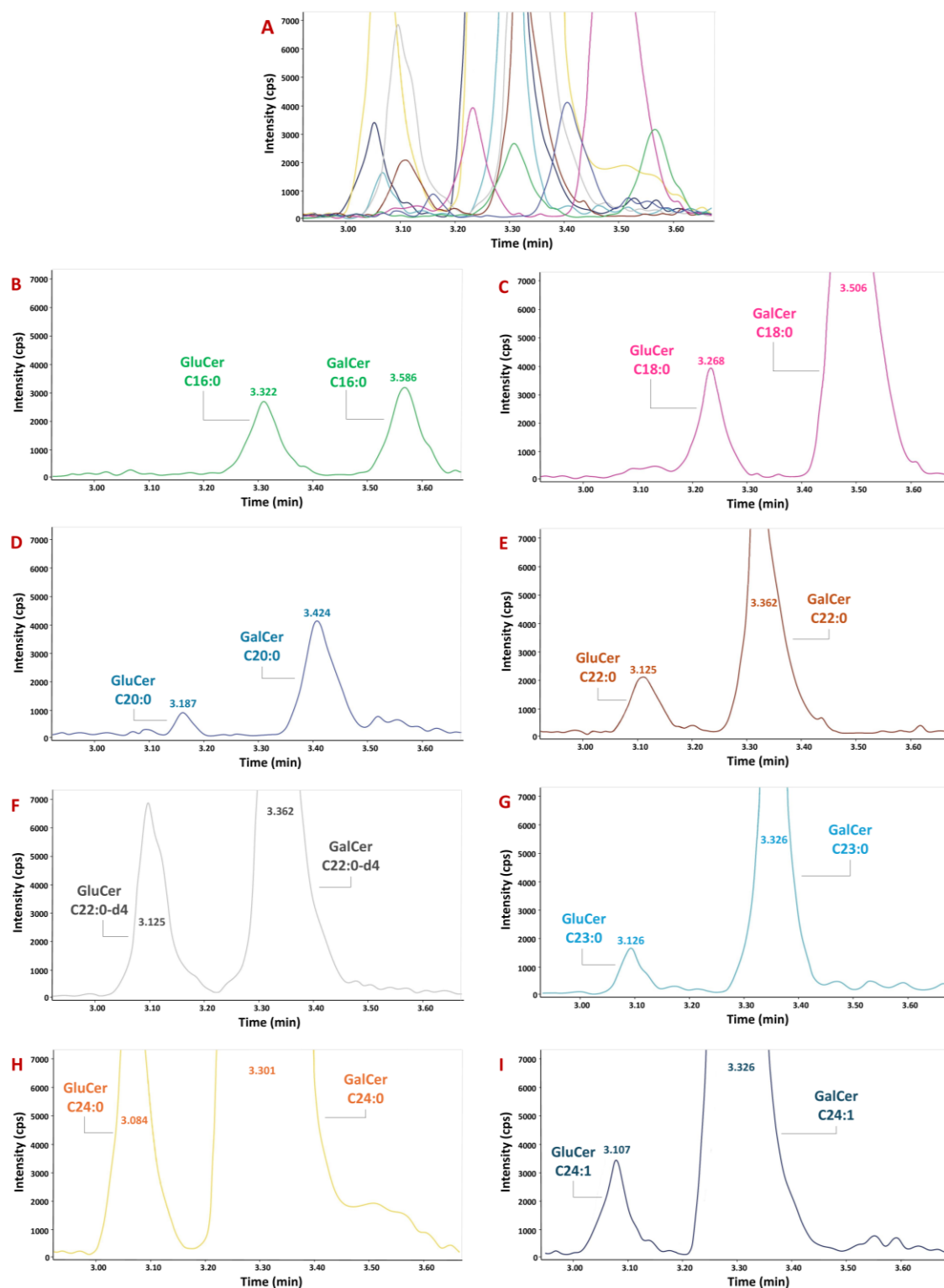


Figura 32. Cromatogramas representativos indicando los tiempos de retención de las isoformas de GluCer y GalCer detectadas mediante HILIC-ESI-MS/MS. A) Cromatograma de una muestra de LCR humano. **B-I)** Ampliación de los cromatogramas correspondientes a cada isoforma, donde se observa una separación eficiente de ambos isómeros, con las isoformas de GluCer eluyendo antes que sus correspondientes isómeros de GalCer.

Tanto la precisión como las desviaciones de las concentraciones retrocalculadas respecto a la concentración nominal en las curvas de calibración se consideraron aceptables, al cumplir con los requisitos establecidos (Tabla 16).

Tabla 16. Desviación respecto a la concentración nominal (sesgo, %) y variabilidad (CV, %) interserie de las concentraciones retrocalculadas a partir de las curvas de calibración (n=4) para cada analito.

Conc. nominal (nM)	GluCer C16:0		GluCer C18:0		GluCer C24:1		GalCer C24:1	
	Sesgo (%)	CV (%)	Sesgo (%)	CV (%)	Sesgo (%)	CV (%)	Sesgo (%)	CV (%)
2,5	18,7	10,0	17,1	25,3	28,1	8,8	26,4	9,7
5	5,8	6,0	0,1	13,8	-5,1	4,7	1,6	5,8
10	-4,6	14,0	1,3	10,1	1,4	3,1	-6,6	8,1
25	-11,4	0,6	-4,7	11,9	-10,2	4,2	-12,6	2,8
50	-8,9	8,5	-5,6	10,5	-7,5	12,3	-10,4	4,4
100	1,0	7,7	-0,8	10,6	1,8	8,9	5,7	4,8
200	3,6	1,2	2,3	1,7	2,8	1,8	1,4	2,6

En el estudio de equivalencia entre matriz artificial y nativa, una de las muestras de aLCR mostró un exceso de analitos endógenos en el blanco y fue excluida del estudio. La presencia de compuestos endógenos también dificultaron los cálculos a 50 nM. Por tanto, sólo fue posible estudiar la variabilidad entre las áreas ratio de cada estándar a 100 nM preparado en aLCR y en nLCR, que fue inferior al 15 % (Tabla 17).

Tabla 17. Evaluación de la equivalencia entre la matriz artificial (aLCR) y nativa (nLCR).

	GluCer C16:0	GluCer C18:0	GluCer C24:1
100nM standard aLCR (area ratio)	0,3001	0,0900	0,2283
100nM standard nLCR (area ratio)	0,3600	0,1103	0,2570
CV, %	12,8	14,3	8,4

5.2.3. Límite de blanco, límite de detección y límite de cuantificación.

El LoB se estimó entre 0,29 y 1,05 nM, y el LoD, entre 0,53 y 1,93 nM (Tabla 18). El LoQ se fijó en 5 nM, con una veracidad y precisión interserial $\leq 16\%$ para todas las isoformas (Tabla 19) y una relación señal/ruido (S/N) $>10:1$.

Tabla 18. Estimación de la capacidad de detección del método.

	GluCer C16:0	GluCer C18:0	GluCer C24:1	GalCer C24:1
LoB, nM	1,05	0,50	0,29	0,39
LoD, nM	1,93	0,86	0,53	0,80
Zero samples, S/N	3,79	1,73	1,20	1,58
LLQC 5nM samples, S/N	26,51	10,46	19,42	20,76

5.2.4. Precisión y veracidad.

La precisión y la veracidad entre series analíticas oscilaron entre el 10,9 % y el 12,5 % y entre el 0,6 % y el 9,0 % a 20 nM; entre el 9,2 % y el 11,3 % y entre el 0,6 % y el 6,4 % a 50 nM; y entre el 8,5 % y el 11,6 % y entre el 3,0 % y el 8,5 % a 100 nM, respectivamente (Tabla 19).

5.2.5. Selectividad.

La identificación de los compuestos se confirmó mediante la coincidencia de los TR en las muestras de LCR con los correspondientes estándares, con una variación inferior al $\pm 2,5\%$ (Figuras 30 y 32). Las señales obtenidas para las transiciones de los analitos en muestras de blanco no fueron distinguibles del ruido de fondo. Asimismo, la transición ficticia permitió descartar la presencia de interferencias en los TR correspondientes a los analitos (Figura 33), lo que confirmó la ausencia de *product-ion cross talk*.

Tabla 19. Resultados de la evaluación de la precisión (CV, %) y veracidad (sesgo, %) intra e interserie.

Muestra	Analito	Serie	Intraserie ^a			Interserie ^b	
			Media, nM	CV, %	Sesgo, %	CV, %	Sesgo, %
LLQC – 5nM n=10	GluCer C16:0	1	5,77	18,6	15,4	15,2	16,0
		2	5,83	13,9	16,6		
	GluCer C18:0	1	4,36	10,4	-12,9	12,5	-8,8
		2	4,76	13,9	-4,7		
	GluCer C24:1	1	5,51	11,9	10,1	16,5	13,4
		2	5,83	21,2	16,7		
	GalCer C24:1	1	5,11	14,2	2,3	16,6	2,4
		2	5,13	20,9	2,5		
LQC - 20nM n=15	GluCer C16:0	1	18,88	8,1	-5,6	12,5	-5,9
		2	19,52	12,9	-2,4		
		3	18,14	12,1	-9,3		
	GluCer C18:0	1	18,16	13,2	-9,2	11,2	-9,0
		2	18,82	12,8	-5,9		
		3	17,60	8,8	-12,0		
	GluCer C24:1	1	20,45	5,3	2,2	12,2	-0,6
		2	21,09	12,2	5,4		
		3	18,22	13,5	-8,9		
	GalCer C24:1	1	21,11	6,6	5,5	10,9	4,0
		2	21,56	10,5	7,8		
		3	19,81	14,3	-1,0		
MQC - 50nM n=15	GluCer C16:0	1	42,76	9,9	-14,5	11,3	-6,4
		2	52,29	5,0	4,6		
		3	45,39	7,8	-9,2		
	GluCer C18:0	1	47,65	9,3	-4,7	9,2	-3,8
		2	52,18	6,2	4,4		
		3	44,44	2,2	-11,1		
	GluCer C24:1	1	46,09	7,1	-7,8	10,1	0,6
		2	55,74	4,3	11,5		
		3	49,12	7,5	-1,8		
	GalCer C24:1	1	46,85	8,3	-6,3	7,2	-1,9
		2	51,50	7,1	3,0		
		3	48,83	3,2	-2,3		

(Cont.)

Tabla 19 (Cont.). Resultados de la evaluación de la precisión (CV, %) y veracidad (sesgo, %) intra e interserie.

Muestra	Analito	Serie	Intraserie ^a			Interserie ^b	
			Media, nM	CV, %	Sesgo, %	CV, %	Sesgo, %
HQC - 100nM n=15	GluCer C16:0	1	90,90	7,7	-9,1	11,2	-5,6
		2	101,31	9,0	1,3		
		3	89,30	13,9	-10,7		
	GluCer C18:0	1	96,43	7,8	-3,6	11,6	3,0
		2	108,31	14,9	8,3		
		3	116,02	3,9	16,0		
	GluCer C24:1	1	104,72	5,3	4,7	8,5	3,3
		2	105,75	8,7	5,7		
		3	98,83	11,5	-1,2		
	GalCer C24:1	1	111,54	6,7	11,5	9,8	8,5
		2	112,56	9,9	12,6		
		3	100,42	9,9	0,4		

^a Cinco réplicas reportadas para cada serie analítica independiente. ^b Combinación de los datos de todas las series

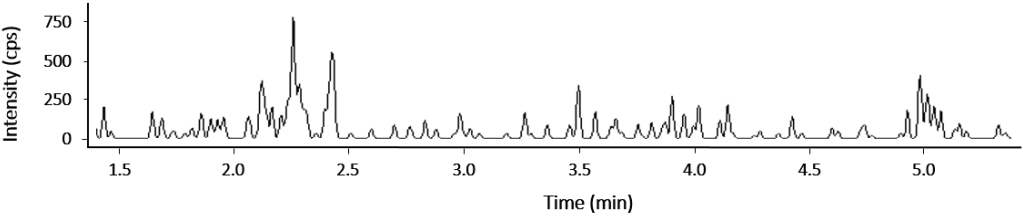


Figura 33. Monitorización de la transición ficticia. Cromatograma resultado de la monitorización de la transición ficticia (m/z 600>264.3) durante la inyección del calibrador de concentración más alta en el ensayo de validación de *cross-talk*.

Tabla 20. Evaluación de la reactividad cruzada entre canales MS/MS. ^a

Respuesta relativa del área del pico (%)	Transición monitorizada (TR, min)													
	GluCer C16:0 (3,345)	GalCer C16:0 (3,586)	GluCer C18:0 (3,268)	GalCer C18:0 (3,506)	GluCer C20:0 (3,202)	GalCer C20:0 (3,434)	GluCer C22:0 (3,141)	GalCer C22:0 (3,362)	GluCer C23:0 (3,126)	GalCer C23:0 (3,326)	GluCer C24:0 (3,084)	GalCer C24:0 (3,301)	GluCer C24:1 (3,112)	GalCer C24:1 (3,326)
Inyección del estándar (200 nM)	GluCer C16:0	100,0	n.d.	0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	GluCer C18:0	0,20	n.d.	100,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	GluCer C24:1	0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,64	n.d.	100,0	n.d.
	GalCer C24:1	0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,82	n.d.	100,0
	GluCer C22:0-d ₄	0,09	n.d.	0,07	n.d.	n.d.	0,10	n.d.	0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	100,0
	GalCer C22:0-d ₄	0,05	n.d.	n.d.	n.d.	0,18	n.d.	0,11	n.d.	0,08	n.d.	n.d.	n.d.	0,86
														100,0

^a Se monitorizó la respuesta del área del pico residual (%) en el tiempo de retención (TR) de cada transición, respecto al área del pico del estándar inyectado (considerada como el 100,0 % de la señal). *n.d.*: no detectado.

Al evaluar la posible contribución cruzada de cada estándar individual y del IS a las transiciones restantes, todas las señales resultaron ser despreciables ($\leq 1\%$), con la única excepción de la transición de C24:0, cuya señal representó $<8\%$ tras la inyección del estándar de C24:1 a la concentración más elevada (Tabla 20).

5.2.6. Estabilidad.

Los QCs se mantuvieron estables durante al menos cuatro semanas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, dos meses a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, con un ciclo de congelación-descongelación, y tras la reinyección de muestras reconstituidas dejadas durante la noche en el automuestreador. Se observaron pérdidas estadísticamente significativas del -68% para todos los analitos cuando las muestras se mantuvieron a $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. En el caso de GalCer C24:1, se detectó un aumento leve pero significativo tras 24 horas a temperatura ambiente (Figura 34 y Tabla 21).

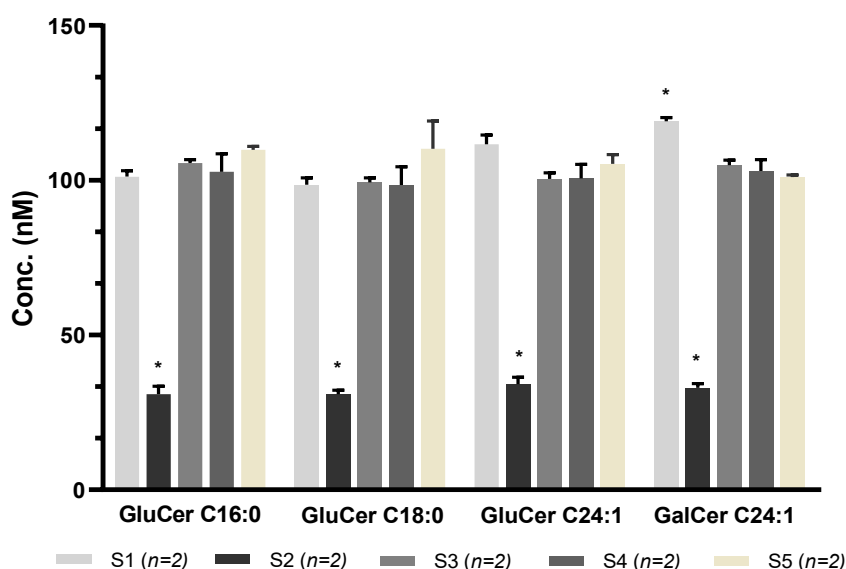


Figura 34. Representación gráfica del estudio de estabilidad de las muestras. Los *boxplots* se presentan como media $\pm$ SD. S1: 24 h a temperatura ambiente; S2: 48 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; S3: 1 mes a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; S4: 2 meses a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; S5: 1 ciclo de congelación-descongelación. * $p < 0,05$ respecto a la concentración basal (100 nM).

Tabla 21. Resultados de la evaluación de la estabilidad de las muestras.

Analito		S1 (n=2)	S2 (n=2)	S3 (n=2)	S4 (n=2)	S5 (n=2)
GluCer C16:0	Media, nM	101,2	30,8	105,5	102,7	109,8
	CV, %	1,8	8,4	1,1	5,7	1,0
	Sesgo, %	1,2	-69,2	5,5	2,7	9,8
	p-valor	0,5255	0,0170*	0,0920	0,6293	0,0519
GluCer C18:0	Media, nM	98,5	30,8	99,3	98,4	110,1
	CV, %	2,3	4,2	1,4	6,0	8,2
	Sesgo, %	-1,5	-69,2	-0,7	-1,6	10,1
	p-valor	0,5205	0,0087*	0,6112	0,7724	0,3559
GluCer C24:1	Media, nM	111,6	34,1	100,4	100,6	105,3
	CV, %	2,6	6,4	2,0	4,5	2,8
	Sesgo, %	11,6	-65,9	0,4	0,6	5,3
	p-valor	0,1140	0,0150*	0,8228	0,8820	0,2402
GalCer C24:1	Media, nM	118,1	32,9	104,9	103,0	101,0
	CV, %	1,1	4,1	1,5	3,5	0,7
	Sesgo, %	19,0	-67,1	4,9	3,0	1,0
	p-valor	0,0301*	0,0090*	0,1482	0,4546	0,2952

Se presentan la media, la variación (CV, %) y la desviación (sesgo, %) respecto a la concentración nominal (100 nM). *p<0,05. S1: 24 h a temperatura ambiente; S2: 48 h a 4 °C; S3: 1 mes a -20 °C; S4: 2 meses a -80 °C; S5: 1 ciclo de congelación-descongelación.

5.2.7. Arrastre.

Las áreas de pico correspondientes a cada isoforma en sus respectivos TR en las muestras de blanco inyectadas tras los estándares a 200 nM no mostraron diferencias respecto a la señal-ruido (Figura 35).

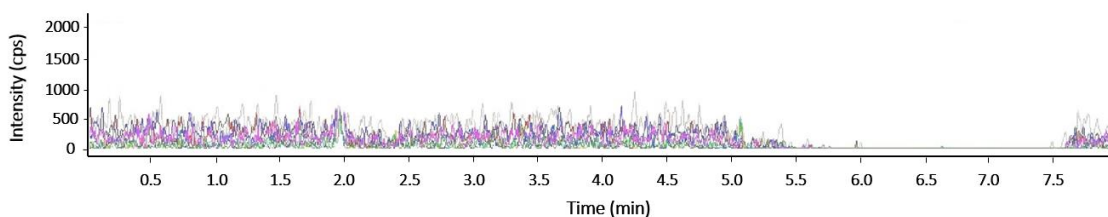


Figura 35. Estudio de arrastre. Cromatograma de una muestra de blanco tras la inyección del calibrador de mayor concentración en el ensayo de arrastre. Se muestran todas las transiciones monitorizadas.

6

Resultados Sección II: Integración de estrategias para la evaluación del efecto matriz

6.1. RESULTADOS TEÓRICOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

La integración en un único diseño experimental de los cálculos derivados de las diversas recomendaciones para evaluar el efecto matriz, recuperación y eficiencia del proceso, resultó en un flujo de trabajo formado por tres estrategias que permitió evaluar de manera conjunta y complementaria los factores que influyen en el rendimiento del método. A continuación, se presentan los resultados teóricos del flujo propuesto, esquematizado en la Figura 36.

6.1.1. Primera estrategia.

Esta estrategia permite analizar de forma aditiva la contribución de las distintas fuentes de variabilidad a lo largo del procedimiento experimental, y valorar la capacidad del IS para compensarlas. En el set 1, los CV de las áreas absolutas reflejaron la variabilidad del sistema analítico, que incluye tanto la preparación de las muestras como el rendimiento cromatográfico y del detector de masas. El set 2 incorporó el efecto matriz relativo, representando la variabilidad introducida por la matriz cuando se añade la misma cantidad del compuesto estudiado. Por último, el set 3 integró la variabilidad derivada de las recuperaciones entre diferentes lotes, sirviendo así como indicador de la precisión global del método asociada a la medición del estándar. De esta manera, cada set acumuló las fuentes de variabilidad de los anteriores. Los CV de las áreas ratio estándar/IS permitieron evaluar en cada etapa la capacidad del IS para compensar estas variaciones. Además, mediante los diagramas de dispersión se analizó la correlación entre las respuestas del estándar y del IS, observándose posibles patrones compartidos en la respuesta. La presencia de una tendencia positiva indicaría que las variaciones del IS entre lotes siguen un comportamiento paralelo al del estándar, sugiriendo una compensación efectiva por parte del IS frente a la variabilidad observada. Por último, la variabilidad de las pendientes obtenidas a partir de las áreas ratio en cada concentración proporciona un valor adicional que integra el intervalo de concentraciones estudiado. Esta medida permite estimar la homogeneidad de la respuesta entre lotes ante los factores de variabilidad considerados en cada set.

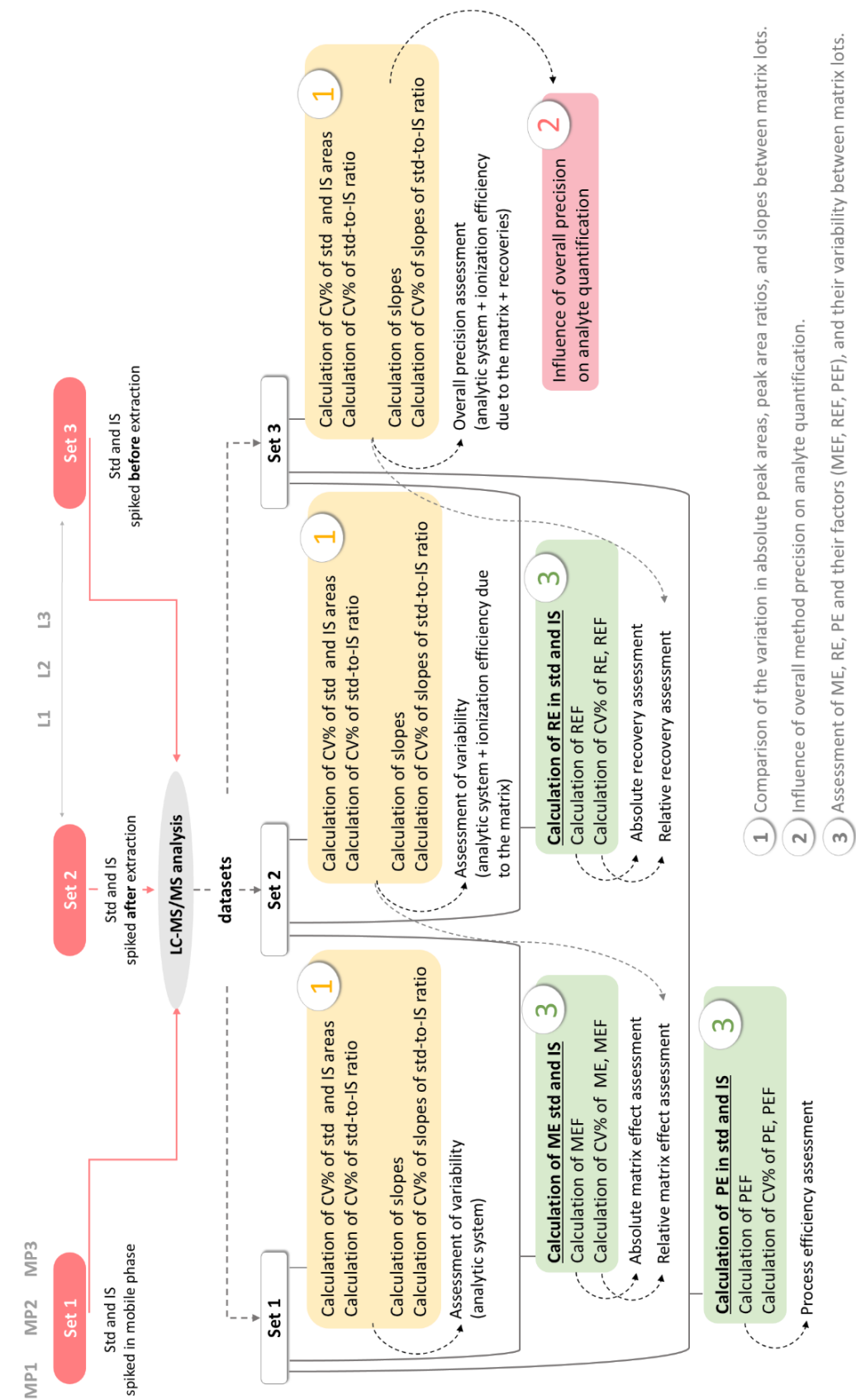


Figura 36. Esquema que recoge el flujo de trabajo con las tres estrategias empleadas para el estudio integral del efecto matriz, y las conexiones entre los distintos descriptores evaluados.

6.1.2. Segunda estrategia.

Esta estrategia se centra en valorar cómo la variabilidad acumulada a lo largo de todo el procedimiento experimental, incluyendo el efecto matriz, la recuperación y el rendimiento del sistema analítico, influye en la cuantificación final del analito.

6.1.3. Tercera estrategia.

Esta estrategia profundiza en el análisis individual del efecto matriz, la recuperación y la eficiencia global del proceso, así como en su comportamiento relativo frente al IS. Los parámetros ME, RE y PE representan, respectivamente, el efecto de la matriz sobre la eficiencia de ionización del analito, la fracción del compuesto recuperada tras las etapas de extracción y procesamiento del método, y la eficiencia global resultante de la combinación de ambos factores.

La relación entre ME y RE (identificada mediante diagramas de dispersión) puede proporcionar información sobre la relación entre la recuperación de interferentes de la matriz que influyen en la ionización de los analitos. Una correlación positiva sugiere que una mayor recuperación se asocia a un menor efecto matriz, lo que indicaría una mayor eficacia del proceso en la eliminación de compuestos interferentes. En cambio, una correlación negativa implicaría que una mayor recuperación conlleva un aumento del efecto matriz, posiblemente debido al arrastre de componentes endógenos que afectan negativamente a la eficiencia de ionización del analito.

Para estimar en qué medida estos procesos afectan diferencialmente al analito en relación con el IS, se calcularon los factores normalizados de efecto matriz (MEF), recuperación (REF) y eficiencia del proceso (PEF). Valores próximos a 1 reflejarían una buena capacidad del IS para compensar el efecto de cada uno de estos factores.

Finalmente, se calculó la variabilidad de estos descriptores, tanto en sus valores absolutos como normalizados por IS, para estimar la robustez del método frente a la variabilidad del efecto matriz y de las recuperaciones entre distintos lotes.

6.1.4. Herramienta Excel.

Se diseñó una plantilla de hoja de cálculo de Microsoft Excel de uso libre, de acuerdo con la estructura de las estrategias descritas (Figura 37). Esta herramienta automatiza los cálculos y la generación de los diagramas de dispersión para facilitar la obtención de los datos y armonizar su análisis. Está disponible para su descarga como Material Suplementario de la publicación de 2025 en *ACS Omega* (Anexo).

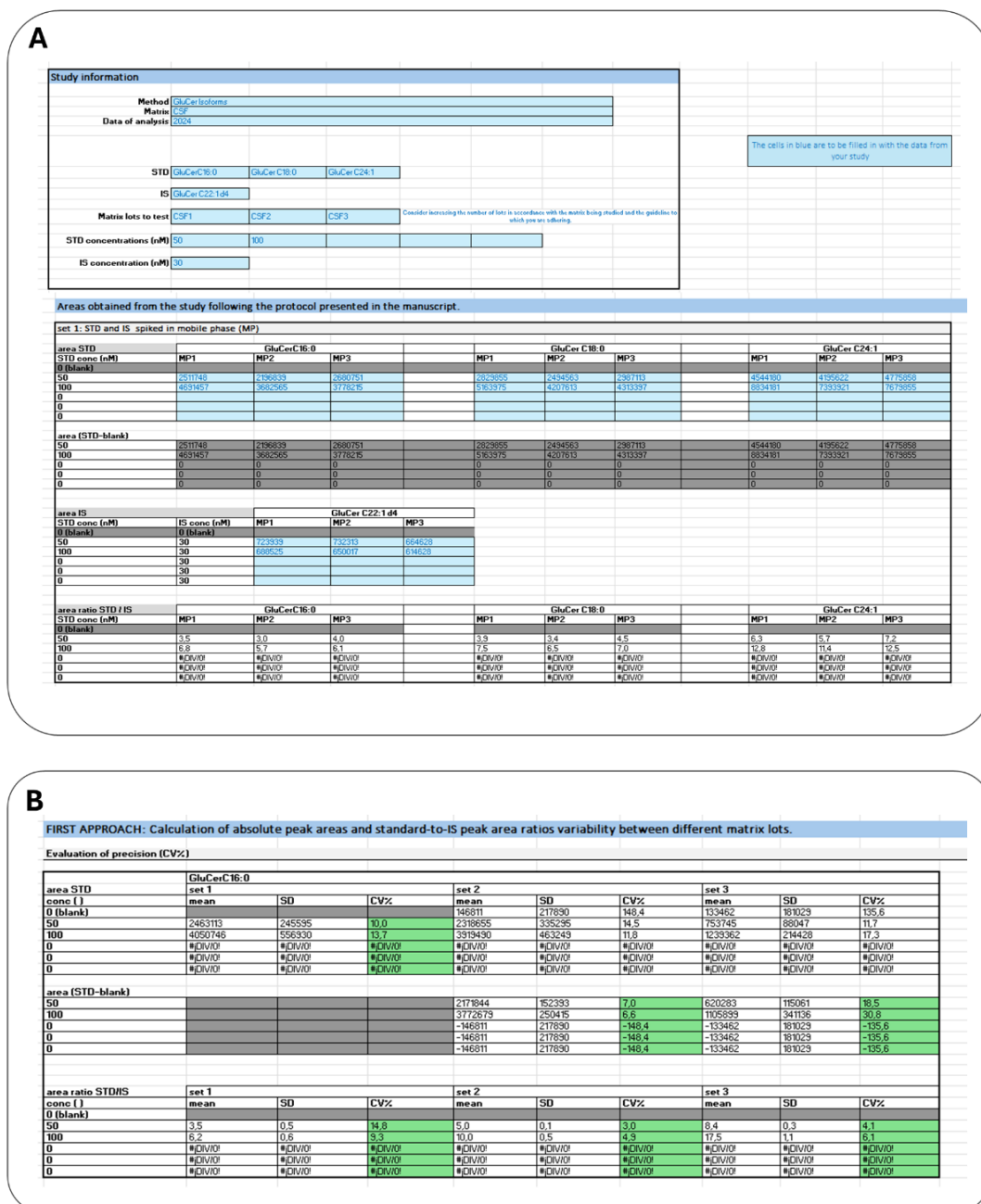


Figura 37. Vista ilustrativa de la herramienta Excel para el estudio integral del efecto matriz, eficiencia de recuperación y eficiencia del proceso. A) Introducción de datos del estudio (concentraciones, analitos, matrices), y ejemplo para la introducción de áreas del set 1. B) Captura de la primera estrategia, para el cálculo del CV de áreas absolutas y áreas ratio, con el ejemplo de C16:0 (cont.).

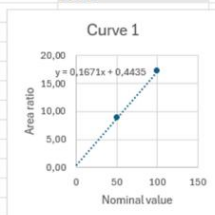
C

SECOND APPROACH: Evaluation of the influence of overall process precision on analyte quantification.

Curves obtained from set 3 and deviation from nominal value.

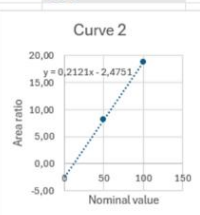
GluCerC16:0

CSF1



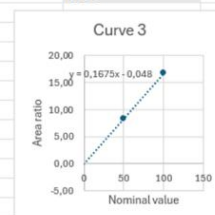
slope: 0,17

CSF2



0,21

CSF3



0,17

Enter here the lots with the most divergent slopes:		CSF1	CSF2
Calculate the concentrations using the two lots with the most divergent slopes, as follows: one lot is used to provide the area ratios and the other to provide the curve equation (based on the concept proposed by J Chromatogr B. 2006 Jan 18;830(2):293-300). Calculate the percentage deviation of the resulting concentrations against the nominal value. (adapted from ICH M10 recommendations and Anal. Chem. 2003, 75(13), 3019-3030). This approach is also consistent with the global ME(%) concept proposed in Anal. Chem. 2017, 89(14), 7560-7568.			
Nominal value	Calculated Concentration	%dev from nominal value	
50	46,10	-7,8	
100	109,50	9,5	
0	enter the calc. conc.	#!VALOR!	
0	enter the calc. conc.	#!VALOR!	
0	enter the calc. conc.	#!VALOR!	

*Considered approach:

Enter here the lots with the most divergent slopes:		CSF1	CSF2
Define here the remaining lot:			
		CSF3	
Calculate the concentrations using the two curve equations obtained from the two lots that showed the most divergent slopes. For each nominal concentration, compare the resulting concentrations using both curves, and determine the relative percent difference between them (adapted from J Chromatogr B. 2006 Jan 18;830(2):293-300).			
Nominal value	Highest calculated conc.	Lowest calculated conc.	max %dev between conc.
50	50,94	47,19	7,9
100	97,28	90,40	7,6
0	enter the calc. conc.	enter the calc. conc.	#!VALOR!
0	enter the calc. conc.	enter the calc. conc.	#!VALOR!
0	enter the calc. conc.	enter the calc. conc.	#!VALOR!

D

THIRD APPROACH: Calculation of ME, RE, PE, MEF, REF, PEF, rME, rRE, rPE, rMEF, rREF, rPEF values.

CV% ME, MEF (normalization of ME)						
conc.	CSF1	CSF2	CSF3	mean	SD	CV (%)
50	79,6	103,9	83,3	88,9	13,1	14,7
ME GluCerC16:0	58,5	63,4	65,2	61,7	4,6	7,4
MEF GluCerC16:0	1,4	1,6	1,3	1,4	0,2	12,6
100	75,9	110,0	98,1	94,7	17,3	18,2
ME GluCerC16:0	49,4	61,7	63,5	58,2	7,7	13,2
MEF GluCerC16:0	1,5	1,8	1,5	1,6	0,1	8,6
0	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!
ME GluCerC16:0	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!
MEF GluCerC16:0	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!
0	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!
ME GluCerC16:0	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!
MEF GluCerC16:0	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!
0	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!
ME GluCerC16:0	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!
MEF GluCerC16:0	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!	#!DIV/0!

Figura 37 (Cont.). Vista ilustrativa de la herramienta Excel para el estudio integral del efecto matriz, eficiencia de recuperación y eficiencia del proceso. (cont.) C) Captura de la segunda estrategia, para el cálculo de la influencia global en la cuantificación del analito, con el ejemplo de C16:0. D) Captura de la tercera estrategia, para el cálculo de ME, MEF, rME y rMEF en el ejemplo de C16:0.

6.2. APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DEL MÉTODO CLÍNICO

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al aplicar el flujo de trabajo al método desarrollado para la cuantificación de GluCer y GalCer en LCR.

6.2.1. Primera estrategia.

La Tabla 22 presenta los CV obtenidos a partir de las áreas absolutas de los estándares y del IS (A), así como de las áreas ratio estándar/IS (B) en los sets 1, 2 y 3, evaluados entre diferentes lotes de LCR.

Tabla 22. Variabilidad (CV, %) en cada set de las áreas absolutas de los estándares y del IS, y de las áreas ratio a cada concentración individual entre distintos lotes de LCR.

A. Áreas absolutas (CV, %)

Conc.	C16:0			C18:0			C24:1			C22:0-d4		
	Set 1	Set 2	Set 3	Set 1	Set 2	Set 3	Set 1	Set 2	Set 3	Set 1	Set 2	Set 3
50 nM	10,0	7,0	18,5	9,1	9,8	15,7	6,5	10,4	16,6	5,2	6,4	14,8
100 nM	13,7	6,6	30,8	11,5	8,0	33,8	9,6	7,6	32,1	5,7	8,7	34,1

B. Áreas ratio (CV,%)

Conc.	C16:0/C22:0-d4			C18:0/C22:0-d4			C24:1/C22:0-d4		
	Set 1	Set 2	Set 3	Set 1	Set 2	Set 3	Set 1	Set 2	Set 3
50 nM	14,8	3,0	4,1	13,8	8,0	1,3	11,5	7,5	2,1
100 nM	9,3	4,9	6,1	7,3	3,3	2,6	6,2	4,1	3,3

En los sets 1 y 2, los CV de las áreas absolutas oscilaron entre el 5,2 % y el 13,7 %, y entre el 6,4 % y el 10,4 %, respectivamente. En el set 3, los CV fueron similares entre compuestos, pero mostraron diferencias claras según la concentración: oscilaron entre el 14,8 % y el 18,5 % a 50 nM, y entre el 30,8 % y el 34,1 % a 100 nM. En todos los casos, los valores del set 3 superaron a los observados en los sets anteriores.

Los CV calculados a partir de las áreas ratio fueron inferiores a los de las áreas absolutas en todos los casos, salvo en el set 1 a 50 nM. En el set 3, la reducción de la variabilidad tras normalización con IS fue particularmente marcada (entre 1,3 % y el 6,1 %).

Estas observaciones fueron consistentes con los patrones de correlación entre las áreas del analito y del IS (Figura 38). En el set 1 se identificó una correlación negativa a 50 nM y positiva a 100 nM, mientras que en los sets 2 y 3 fueron positivas a ambas concentraciones, con coeficientes de correlación (r) en el set 3 de entre 0,994 y 0,999.

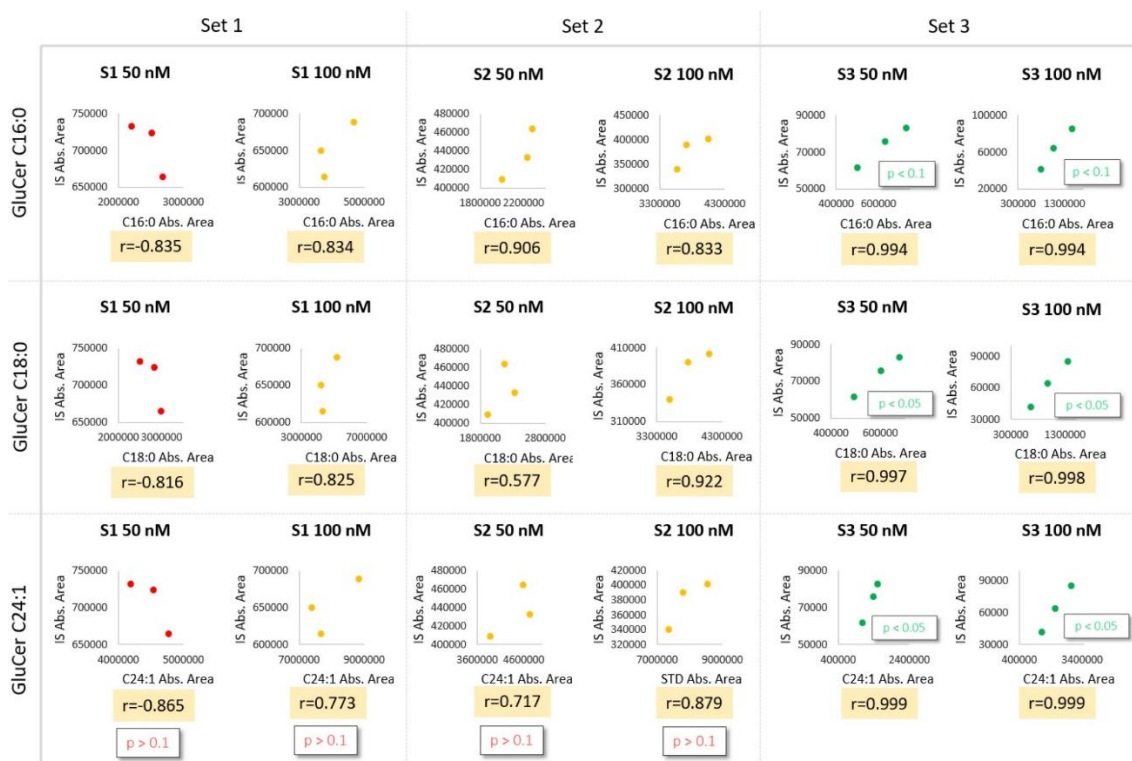


Figura 38. Diagramas de dispersión de las áreas de los picos absolutos de los estándares y del IS para cada set y concentración. Se indican los coeficientes de correlación de Pearson (r). Correlaciones positivas, especialmente cuando son estadísticamente significativas, sugieren que la respuesta del IS sigue un patrón paralelo al de los estándares, lo que indicaría una compensación efectiva del IS frente a la variabilidad del estándar.

En cuanto a las curvas generadas, los CV de las pendientes entre lotes (Tabla 23) siguieron un patrón similar al observado para las áreas ratio, con los valores más bajos en el set 3, aunque con una variabilidad en general más elevada.

Tabla 23. Precisión (CV %) de las pendientes obtenidas con distintos lotes de matriz.

Lote	C16:0			C18:0			C24:1		
	Set 1	Set 2	Set 3	Set 1	Set 2	Set 3	Set 1	Set 2	Set 3
LCR1	0,07	0,11	0,17	0,07	0,11	0,15	0,13	0,24	0,31
LCR2	0,05	0,10	0,21	0,06	0,11	0,16	0,11	0,23	0,36
LCR3	0,04	0,09	0,17	0,05	0,09	0,15	0,11	0,18	0,30
Media	0,05	0,10	0,18	0,06	0,10	0,15	0,12	0,22	0,32
SD	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,03
CV (%)	22,7	12,7	12,6	17,4	14,2	3,8	11,0	14,9	9,9

6.2.2. Segunda estrategia.

La Tabla 24 muestra las desviaciones entre las concentraciones calculadas y los valores nominales en el set 3. En todos los casos, dichas desviaciones fueron inferiores al 10 %, tanto para los distintos estándares como para ambas concentraciones evaluadas.

Tabla 24. Desviación al valor nominal de las concentraciones calculadas a partir de las curvas obtenidas en la primera estrategia.

Conc. nominal (nM)	C16:0 ^a		C18:0 ^b		C24:1 ^c	
	Conc. Calc.	Sesgo	Conc. Calc.	Sesgo	Conc. Calc.	Sesgo
	(nM)	(%)	(nM)	(%)	(nM)	(%)
50	46,1	-7,8	49,7	-0,6	52,0	4,0
100	109,5	9,5	95,0	-5,0	94,2	-5,8

^a Conc calculada del área ratio de LCR2 con ecuación de la curva de LCR1 $y = 0,17x + 0,44$; ^b Conc calculada del área ratio de LCR3 con ecuación de la curva de LCR2 $y = 0,16x - 0,10$; ^c Conc calculada del área ratio de LCR3 con ecuación de la curva de LCR1 $y = 0,36x - 0,27$.

6.2.3. Tercera estrategia.

Los resultados se resumen en la Tabla 25. Los valores de ME para los estándares se situaron entre el 77,6 y el 100,0 %, con mayor supresión iónica en C18:0. Los valores de RE y PE de los estándares variaron entre el 27 y el 30,6%, y entre el 21,3 y el 29,3%, respectivamente.

Tabla 25. Estimadores de ME, RE, PE y sus factores normalizados MEF, REF y PEF (media y CV%).

50 nM	C22:0-d4	C16:0		C18:0		C24:1	
	ME	ME	MEF	ME	MEF	ME	MEF
media	61,7	88,9	1,4	77,6	1,3	97,8	1,6
CV (%)	7,4	14,7	12,6	12,7	8,4	12,2	7,5
	RE	RE	REF	RE	REF	RE	REF
media	17,0	28,9	1,7	28,0	1,6	30,6	1,8
CV (%)	20,8	25,4	5,8	23,7	8,6	25,3	6,9
	PE	PE	PEF	PE	PEF	PE	PEF
media	10,4	25,1	2,4	21,3	2,1	29,3	2,8
CV (%)	16,8	13,6	13,7	10,7	14,0	12,7	9,4

100 nM	C22:0-d4	C16:0		C18:0		C24:1	
	ME	ME	MEF	ME	MEF	ME	MEF
media	58,2	94,7	1,6	84,4	1,4	100,0	1,7
CV (%)	13,2	18,2	8,6	18,0	8,2	16,1	8,1
	RE	RE	REF	RE	REF	RE	REF
media	17,3	29,8	1,8	27,0	1,6	27,9	1,6
CV (%)	42,6	36,6	6,3	41,2	1,5	38,8	4,0
	PE	PE	PEF	PE	PEF	PE	PEF
media	9,8	26,9	2,8	21,7	2,3	26,7	2,8
CV (%)	31,1	18,9	14,4	23,7	8,9	23,4	9,7

Los valores de CV% definen los conceptos relativos (rME, rRE, rPE, rMEF, rREF, rPEF) y representan la variabilidad entre diferentes lotes de matriz de LCR para cada estándar y concentración. *ME: efecto matriz; RE: recuperación; PE: eficiencia del proceso; MEF: factor de efecto matriz; REF: factor de recuperación; PEF: factor de eficiencia del proceso.*

Para el IS fueron notablemente más bajos, situándose en torno al 60 %, 17 % y 10 %, respectivamente, y por ello, tras normalización por IS, los factores calculados fueron superiores a 1: MEF entre 1,2 y 1,6, REF entre 1,5 y 1,8, y PEF por encima de 2, lo que refleja una eficiencia del proceso global superior del estándar frente al IS (Figura 39).

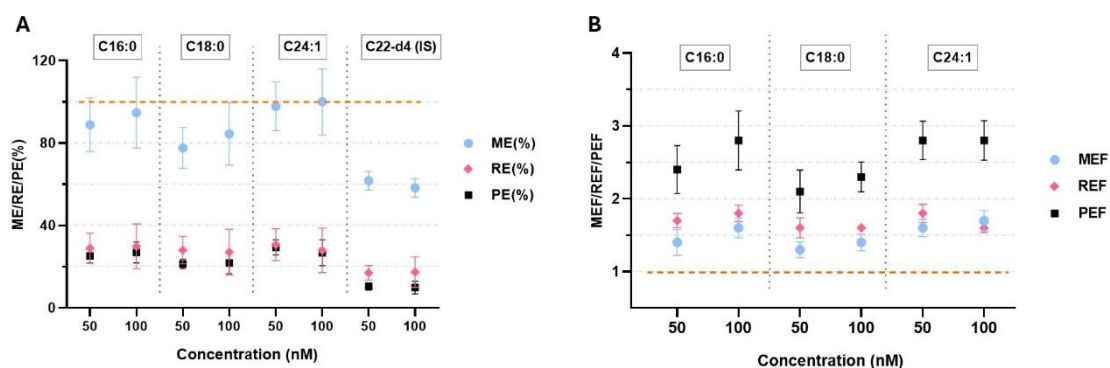


Figura 39. Representación gráfica (A) de los valores de ME, RE y PE y (B) de sus factores normalizados por el IS (MEF, REF, PEF), correspondientes a la tercer estrategia. Los *boxplots* (media $\pm$ SD) muestran la variabilidad entre lotes de matriz (n = 3). La línea discontinua naranja indica el valor ideal (100 % para los valores absolutos y 1 para los factores normalizados). Los menores valores de ME, RE y PE del IS en comparación con los estándares se reflejan en valores de MEF, REF y PEF > 1 para todas las isoformas y concentraciones.

La Tabla 25 también recoge la variabilidad de los valores absolutos (rME, rRE y rPE) entre lotes. Los rME fueron similares entre compuestos (entre 12,2 % y 18,3 %), y menores para el IS (entre 7,4 % y 13,2 %). Los valores de rRE (entre 20,8% y 42,6%) y rPE (entre 10,7 y 31,1%) fueron superiores, especialmente a 100 nM. La variabilidad observada en los valores absolutos dependiente de la concentración (mayor a 100 nM que a 50 nM) se corrigió tras la normalización con el IS. Además, los valores de rMEF (de 7,5 % a 12,6 %), rREF (de 1,5 % a 8,6 %) y rPEF (de 8,9 % a 14,4 %) se redujeron de forma significativa. Aunque los valores de rPEF fueron más altos que los de rMEF y rREF, no superaron el 15 % de CV.

Los diagramas de dispersión mostraron una tendencia negativa entre los valores de ME y RE para cada estándar en ambas concentraciones, lo que indica que los lotes con mayor recuperación también presentaban un mayor efecto matriz, y viceversa (Figura 40). Los coeficientes de correlación oscilaron entre -0,898 y -0,999. Esta tendencia fue menos marcada en el caso del IS.

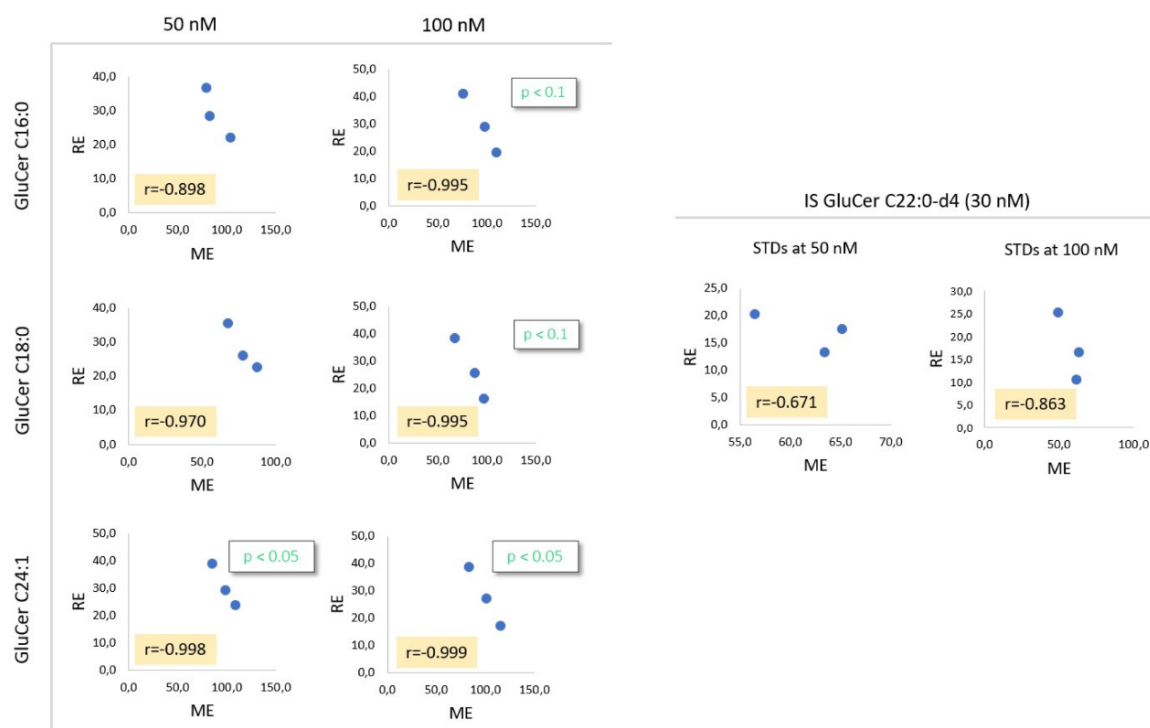


Figura 40. Diagramas de dispersión de la correlación entre ME y RE. La relación negativa entre ambos parámetros se evidenció mediante coeficientes de correlación de Pearson $r \geq -0,9$ en todos los estándares y concentraciones. En el caso del IS, esta correlación no fue tan marcada.

7

Resultados Sección II: Aplicación del método en una cohorte clínica

.

7.1. CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE CLÍNICA

En la Tabla 26 se resumen las características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en la cohorte del estudio.

Tabla 26. Datos demográficos y clínicos de los pacientes.

	CS	EPI	EP-GBA
<i>n</i>	6	22	5
Sexo, (varones/mujeres)	2/4	14/8	3/2
Edad (años)	56,50 ± 10,05	56,40 ± 8,80	61,60 ± 14,11
Edad de inicio (años)	-	54,45 ± 9,33	56,00 ± 12,35
Duración enfermedad (años)	-	0,70 ± 1,78	5,60 ± 6,84
Hoehn & Yahr [245]	-	2,0	2,5 (1)
MDS-UPDRS III [246]	-	28,5 (16,5) ***	31,5 (22,5) **
MoCA [247]	29 (2)	27 (2,75)	27 (1,5)
Genotipos <i>GBA1</i>	N/A	N/A	Variantes de riesgo <i>GBA1</i> : E326K en ID: 30, 33
			Mutaciones leves <i>GBA1</i> : Y205C en ID: 31
			Mutaciones severas <i>GBA1</i> : V15ter en ID: 29 D409H/T369M en ID: 32

Los datos se expresan como media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico), según corresponda. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p \leq 0,001$ frente a CS. CS: *Controles sanos*; EPI: *Enfermedad de Párkinson idiopática sin variantes en GBA1*; EP-GBA: *Enfermedad de Párkinson asociada a variantes en GBA1*; MDS-UPDRS-III: *Escala Unificada para la Evaluación de la Enfermedad de Párkinson III*; MoCA: *Evaluación Cognitiva de Montreal*; N/A: *No aplicable*; ID: *Identificador*.

En los grupos EPI y EP-GBA se recogieron datos clínicos, incluyendo la escala Hoehn & Yahr, la puntuación MDS-UPDRS-III y el test MoCA. En el grupo EP-GBA se identificaron distintas variantes en el gen *GBA1*, clasificadas en función de su gravedad: variantes de riesgo (E326K), mutaciones leves (Y205C) y mutaciones severas (V15Ter, D409H/T369M).

7.2. RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCER Y GALCER EN LCR HUMANO

Las concentraciones de GluCer y GalCer en LCR obtenidas para los distintos grupos de la cohorte se recogen en la Tabla 27. Se observó que GalCer presentaba concentraciones superiores a GluCer en todos los grupos, independientemente del perfil clínico.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas al considerar la suma de todas las isoformas (GluCer total) entre los grupos CS ($30,95 \pm 20,62$ nM), EPi ($22,46 \pm 9,34$ nM) o EP-GBA ($37,08 \pm 31,82$ nM) ($p=0,1872$) (Figura 41A). Sin embargo, al normalizar las concentraciones de GluCer total respecto a sus correspondientes isómeros de GalCer, se observó una tendencia creciente en las medianas de las ratios en CS, EPi y EP-GBA ($0,05 \pm 0,02$; $0,07 \pm 0,05$; $0,08 \pm 0,03$, respectivamente) (Figura 41B). En la Tabla 28 se muestran los resultados de las ratios.

Las ratios de isoformas específicas, como C22:0, C23:0 o C24:0, también resultaron de particular interés debido a su tendencia a presentar medianas más elevadas en EP-GBA en comparación con CS (Figura 41C).

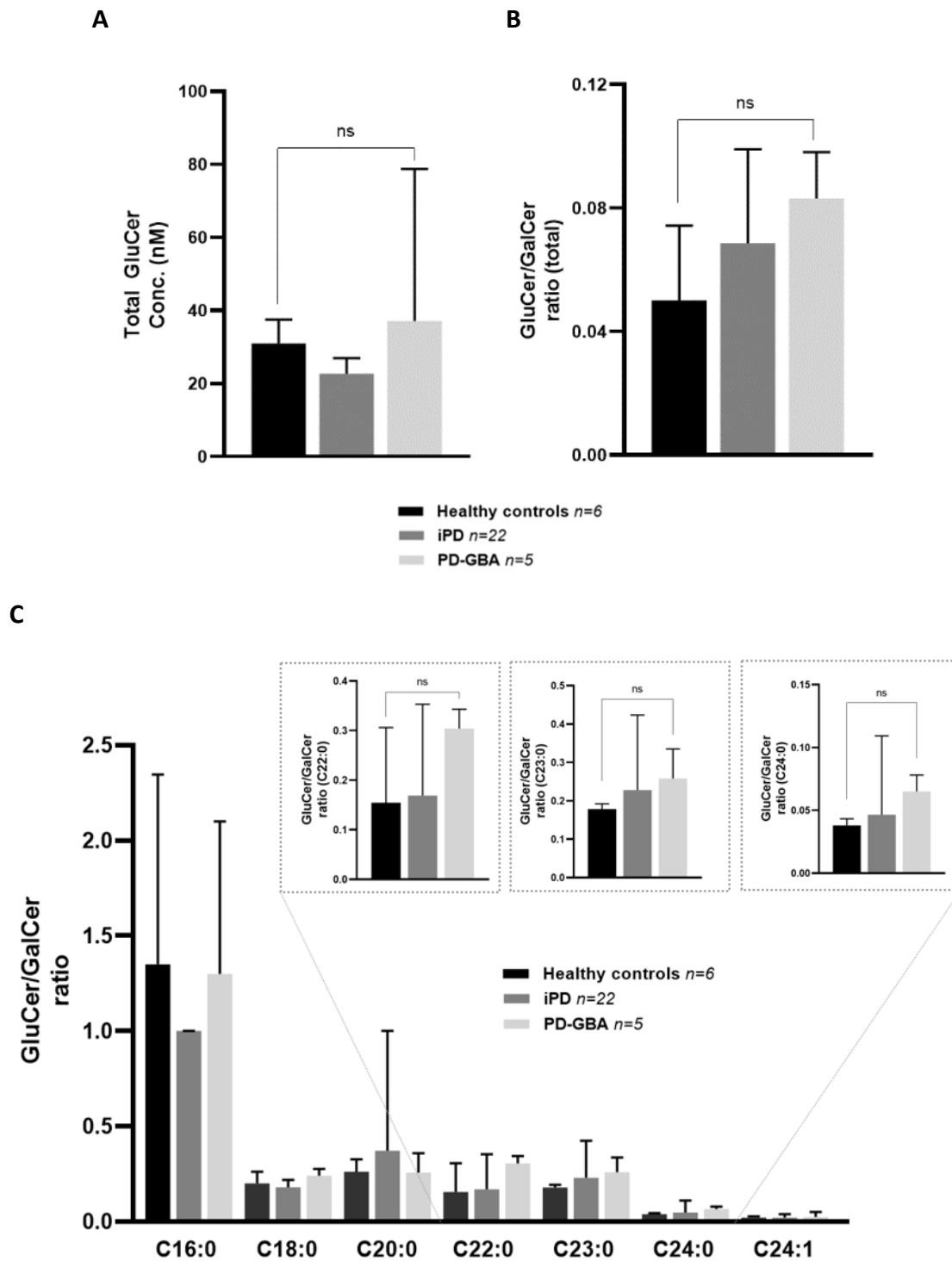


Figura 41. Representación gráfica de las concentraciones de GluCer y las ratios GluCer/GalCer en los tres grupos de la cohorte clínica. Los *boxplots* se presentan como mediana y rango intercuartílico. **A)** Concentración total de las isoformas de GluCer. **B)** GluCer total normalizada por GalCer total. **C)** Ratios GluCer/GalCer para cada isoforma, con especial atención a C22:0, C23:0 y C24:0.

Tabla 27. Concentraciones de isoformas de GluCer y GalCer en LCR en los distintos grupos de la cohorte del estudio.

ID	GluCerC16:0	GalCerC16:0	GluCerC18:0	GalCerC18:0	GluCerC20:0	GalCerC20:0	GluCerC22:0	GalCerC22:0
CS								
1	6,19	<5,00	8,07	28,60	<5,00	6,09	4,98	16,38
2	5,14	5,40	7,72	43,83	<5,00	11,61	5,39	31,15
3	8,98	5,29	10,51	65,21	<5,00	17,63	6,01	44,33
4	5,75	<5,00	6,46	28,89	<5,00	8,42	5,83	18,67
5	<5,00	<5,00	5,47	21,67	<5,00	9,273	<5,00	19,34
6	<5,00	<5,00	<5,00	33,88	<5,00	9,93	<5,00	21,37
	5,45 (2,92)	2,50 (2,09)	7,09 (2,27)	31,39 (12,67)	2,50 (0,0)	9,60 (2,56)	5,189 (2,60)	20,35 (9,87)
EPI								
7	<5,00	6,49	7,18	71,42	<5,00	13,91	<5,00	29,90
8	<5,00	<5,00	6,66	17,99	<5,00	<5,00	<5,00	8,83
9	<5,00	5,33	5,37	27,10	<5,00	5,23	<5,00	14,03
10	<5,00	5,18	7,55	35,95	<5,00	8,63	<5,00	15,58
11	<5,00	<5,00	6,11	29,63	<5,00	6,80	<5,00	12,32
12	11,76	5,50	6,00	33,53	<5,00	6,70	10,42	15,70
13	<5,00	<5,00	6,93	33,15	<5,00	9,61	<5,00	17,33
14	39,08	9,01	14,52	50,90	8,029	12,85	28,42	21,88
15	62,23	11,46	10,33	68,51	7,134	17,56	48,70	40,13
16	<5,00	5,27	<5,00	39,70	<5,00	12,52	<5,00	29,73
17	5,89	<5,00	<5,00	30,29	<5,00	8,88	<5,00	21,38
18	6,62	8,27	9,54	67,17	<5,00	21,01	<5,00	42,68
19	<5,00	<5,00	<5,00	20,15	<5,00	<5,00	<5,00	6,90
20	<5,00	<5,00	6,36	13,13	<5,00	<5,00	<5,00	10,36
21	<5,00	<5,00	<5,00	7,19	<5,00	<5,00	<5,00	5,08
22	<5,00	<5,00	<5,00	23,29	<5,00	8,23	<5,00	16,64
23	<5,00	<5,00	<5,00	16,48	<5,00	<5,00	<5,00	7,14
24	n.d.	<5,00	<5,00	13,90	<5,00	5,10	<5,00	8,21
25	<5,00	<5,00	5,45	23,14	<5,00	<5,00	<5,00	15,63
26	<5,00	<5,00	<5,00	22,00	<5,00	8,77	<5,00	22,17
27	<5,00	7,84	7,12	33,60	<5,00	10,74	<5,00	20,99
28	<5,00	8,39	5,04	45,23	<5,00	8,42	<5,00	24,39
	2,50 (0,0)	2,50 (3,74)	5,72 (4,57)	29,96 (18,15)	2,50 (0,0)	8,32 (7,30)	2,50 (0,0)	16,17 (11,24)
EP-GBA								
29	<5,00	<5,00	4,53	14,92	<5,00	5,96	<5,00	8,24
30	7,66	5,90	7,63	51,49	<5,00	12,72	6,55	28,32
31	5,44	<5,00	8,31	33,58	<5,00	9,77	<5,00	16,59
32	10,03	5,01	10,29	42,85	<5,00	10,60	9,86	26,83
33	11,32	9,65	14,06	71,80	5,50	18,43	15,15	47,43
	7,66 (4,59)	4,97 (3,40)	8,31 (2,66)	42,85 (17,91)	2,50 (0,0)	10,60 (2,95)	6,55 (7,36)	26,83 (11,73)

Las muestras con concentraciones entre el LoD y el LoQ se trataron como el 50% del LoQ. *n.d.*: no detectable.

Tabla 27 (Cont.). Concentraciones de isoformas de GluCer y GalCer en LCR en los distintos grupos de la cohorte del estudio.

ID	GluCerC23:0	GalCerC23:0	GluCerC24:1	GalCerC24:1	GluCerC24:0	GalCerC24:0	GluCer Total	GalCer Total
CS								
1	<5,00	13,28	10,51	263,42	<5,00	63,77	34,75	387,94
2	<5,00	22,83	10,13	475,15	<5,00	112,29	33,38	690,66
3	<5,00	24,97	12,89	586,45	4,90	149,03	45,80	875,28
4	<5,00	12,27	5,49	292,31	<5,00	57,94	28,53	412,59
5	<5,00	14,59	<5,00	280,66	<5,00	56,21	17,97	394,97
6	<5,00	13,47	<5,00	319,49	<5,00	66,86	15,00	457,57
	2,50	14,03	7,81	305,90	2,50	65,32	30,95	435,08
	(0,0)	(7,44)	(7,17)	(152,66)	(0,0)	(41,54)	(13,80)	(233,01)
EPI								
7	<5,00	23,26	10,56	704,44	<5,00	147,51	27,74	983,02
8	<5,00	6,92	6,015	166,22	<5,00	33,70	22,68	236,16
9	<5,00	11,08	5,54	331,69	<5,00	61,87	20,90	451,10
10	<5,00	13,88	5,74	312,37	<5,00	59,45	23,29	442,42
11	<5,00	10,87	10,58	239,75	<5,00	54,54	26,69	349,61
12	<5,00	12,71	11,20	334,29	8,114	62,63	49,99	464,35
13	<5,00	14,60	9,33	283,55	<5,00	69,59	26,26	420,72
14	15,93	15,12	65,25	537,37	25,57	92,45	188,80	726,73
15	20,15	31,09	77,71	614,63	36,24	123,32	255,40	889,14
16	<5,00	21,10	5,13	407,28	<5,00	99,27	17,63	602,36
17	<5,00	13,47	6,78	373,32	<5,00	65,75	22,67	506,71
18	<5,00	30,58	10,68	828,33	<5,00	145,81	34,34	1122,84
19	<5,00	5,47	<5,00	131,70	<5,00	28,14	15,00	194,86
20	<5,00	6,91	<5,00	144,33	<5,00	32,05	18,86	209,29
21	<5,00	<5,00	<5,00	55,069	<5,00	17,95	15,00	90,29
22	<5,00	9,89	<5,00	254,74	<5,00	49,68	15,00	356,74
23	<5,00	<5,00	5,02	100,74	<5,00	22,73	17,52	152,09
24	<5,00	6,06	<5,00	91,59	<5,00	22,96	12,50	145,22
25	<5,00	10,30	6,22	183,71	<5,00	53,03	21,67	288,31
26	<5,00	14,91	5,03	283,01	<5,00	59,90	17,53	404,45
27	<5,00	15,60	7,74	377,69	<5,00	66,99	24,86	522,71
28	<5,00	16,43	7,20	430,17	<5,00	75,56	22,25	600,17
	2,50	13,09	6,12	297,96	2,50	60,89	22,46	431,57
	(0,0)	(7,82)	(5,23)	(229,29)	(0,0)	(36,37)	(9,03)	(331,60)
EP-GBA								
29	<5,00	6,33	<5,00	142,00	<5,00	30,17	17,03	204,16
30	<5,00	23,57	10,25	546,94	<5,00	124,80	37,08	781,02
31	<5,00	14,49	7,35	324,31	<5,00	61,79	28,60	453,26
32	5,36	19,45	17,96	453,78	6,92	95,16	60,42	643,03
33	8,05	31,15	39,24	650,46	9,21	140,64	97,03	951,12
	2,50	19,45	10,25	453,78	2,50	95,16	37,08	643,03
	(2,86)	(9,08)	(10,61)	(222,63)	(4,42)	(63,01)	(31,82)	(327,76)

Las muestras con concentraciones entre el LoD y el LoQ se trataron como el 50% del LoQ. *n.d.: no detectable.*

Tabla 28. Ratios de concentración GluCer/GalCer de las isoformas en LCR en los distintos grupos de la cohorte del estudio.

ID	C16:0	C18:0	C20:0	C22:0	C23:0	C24:1	C24:0	Total
CS								
1	2,48	0,28	0,41	0,30	0,19	0,04	0,04	0,09
2	0,95	0,18	0,22	0,17	0,11	0,02	0,02	0,05
3	1,70	0,16	0,14	0,14	0,10	0,02	0,03	0,05
4	2,30	0,22	0,30	0,31	0,20	0,02	0,04	0,07
5	1,00	0,25	0,27	0,13	0,17	0,01	0,04	0,05
6	1,00	0,07	0,25	0,12	0,19	0,01	0,04	0,03
	1,35	0,20	0,26	0,15	0,18	0,02	0,04	0,05
	(1,15)	(0,08)	(0,07)	(0,14)	(0,06)	(0,01)	(0,01)	(0,02)
EPI								
7	0,39	0,10	0,18	0,08	0,11	0,02	0,02	0,03
8	1,00	0,37	1,00	0,28	0,36	0,04	0,07	0,10
9	0,47	0,20	0,48	0,18	0,23	0,02	0,04	0,05
10	0,48	0,21	0,29	0,16	0,18	0,02	0,04	0,05
11	1,00	0,21	0,37	0,20	0,23	0,04	0,05	0,08
12	2,14	0,18	0,37	0,66	0,20	0,03	0,13	0,11
13	1,00	0,21	0,26	0,14	0,17	0,03	0,04	0,06
14	4,34	0,29	0,63	1,30	1,05	0,12	0,28	0,26
15	5,43	0,15	0,41	1,21	0,65	0,13	0,29	0,29
16	0,48	0,06	0,20	0,08	0,12	0,01	0,03	0,03
17	2,36	0,08	0,28	0,12	0,19	0,02	0,04	0,05
18	0,80	0,14	0,12	0,06	0,08	0,01	0,02	0,03
19	1,00	0,12	1,00	0,36	0,46	0,02	0,09	0,08
20	1,00	0,48	1,00	0,24	0,36	0,02	0,08	0,09
21	1,00	0,35	1,00	0,49	1,00	0,05	0,14	0,17
22	1,00	0,11	0,30	0,15	0,25	0,01	0,05	0,04
23	1,00	0,15	1,00	0,35	1,00	0,05	0,11	0,12
24	-	0,18	0,49	0,30	0,41	0,03	0,11	0,09
25	1,00	0,24	1,00	0,16	0,24	0,03	0,05	0,08
26	1,00	0,11	0,29	0,11	0,17	0,02	0,04	0,04
27	0,32	0,21	0,23	0,12	0,16	0,02	0,04	0,05
28	0,30	0,11	0,30	0,10	0,15	0,02	0,03	0,04
	1,00	0,18	0,37	0,17	0,23	0,02	0,05	0,07
	(0,52)	(0,10)	(0,62)	(0,22)	(0,23)	(0,02)	(0,07)	(0,05)
EP-GBA								
29	1,00	0,30	0,42	0,30	0,40	0,02	0,08	0,08
30	1,30	0,15	0,20	0,23	0,11	0,02	0,02	0,05
31	2,18	0,25	0,26	0,15	0,17	0,02	0,04	0,06
32	2,02	0,24	0,24	0,37	0,28	0,04	0,07	0,09
33	1,17	0,20	0,30	0,32	0,26	0,06	0,07	0,10
	1,30	0,24	0,26	0,30	0,26	0,02	0,07	0,08
	(0,85)	(0,05)	(0,06)	(0,09)	(0,10)	(0,02)	(0,03)	(0,03)

Los datos grupales se expresan como mediana (rango intercuartílico).

En la Tabla 29 se presentan los datos de las ratios en el grupo EP-GBA subclasificado según el tipo de variante. De nuevo, se observa una tendencia no estadísticamente significativa en las ratios totales, y especialmente en isoformas específicas como C22:0, C23:0 o C24:0, con valores más elevados en los pacientes portadores de mutaciones severas en *GBA1* en comparación con aquellos con variantes leves o de riesgo.

Tabla 29. Ratios de concentración GluCer/GalCer de las isoformas en LCR en el grupo EP-GBA, subclasificado según la gravedad de la mutación en el gen *GBA1*.

Ratio	Variantes riesgo + leves EP-GBA (n=3)	Mutaciones severas EP-GBA (n=2)
C16:0	1,30 (1,01)	1,51 (1,02)
C18:0	0,20 (0,10)	0,27 (0,06)
C20:0	0,26 (0,10)	0,33 (0,18)
C22:0	0,23 (0,04)	0,34 (0,06)
C23:0	0,17 (0,15)	0,34 (0,12)
C24:1	0,02 (0,04)	0,03 (0,02)
C24:0	0,04 (0,04)	0,08 (0,01)
Total	0,06 (0,06)	0,09 (0,01)

Los pacientes portadores de variantes de riesgo y de variantes leves se consideraron como un único subgrupo debido al tamaño muestral limitado. Los datos se expresan como mediana (rango intercuartílico).

Dentro del grupo EPi, se identificaron dos pacientes portadores de variantes en *ATP13A2*, gen que codifica una proteína lisosomal (Tabla 1). Estos casos presentaron una mediana de las ratios más elevada en comparación con el resto del grupo ($0,16 \pm 0,02$ y $0,07 \pm 0,03$, respectivamente), si bien la diferencia no alcanzó significación estadística. Dado el número reducido de casos, estos resultados debe considerarse como una observación preliminar y exploratoria.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que GalCer presenta concentraciones superiores a GluCer en LCR humano, y, aunque no se observaron diferencias significativas en las concentraciones totales de GluCer entre los grupos, la normalización por GalCer permitió identificar tendencias crecientes, especialmente en el subgrupo EP-GBA y en portadores de mutaciones severas.

8

Discusión

En este capítulo se discuten los resultados relacionados con la Sección I (apartado 8.1), vinculados al primer objetivo específico, y los relativos a la Sección II (apartados 8.2 a 8.6), vinculados al segundo, tercer y cuarto objetivos. Finalmente, se presentan las limitaciones de la tesis (apartado 8.7) y se abordan perspectivas futuras (apartado 8.8).

8.1. MÉTODOS PRECLÍNICOS COMO PRUEBA DE CONCEPTO

El desarrollo de métodos preclínicos en una primera fase del presente trabajo ha proporcionado un marco experimental útil para la detección de alteraciones cuantificables en analitos como GluSph o HexSph y las isoformas de GluCer o HexCer. La implementación de métodos en matrices como tejido cerebral o pellets celulares requirió adaptaciones específicas a partir del método asistencial en suero en función de sus características, incluyendo ajustes en los protocolos de pretratamiento, en las condiciones cromatográficas y en los parámetros de adquisición del MS (Figura 42). Estos métodos se encuentran en fase de prevalidación, por lo que podrían considerarse ajustes metodológicos en el futuro que mejoren su rendimiento.

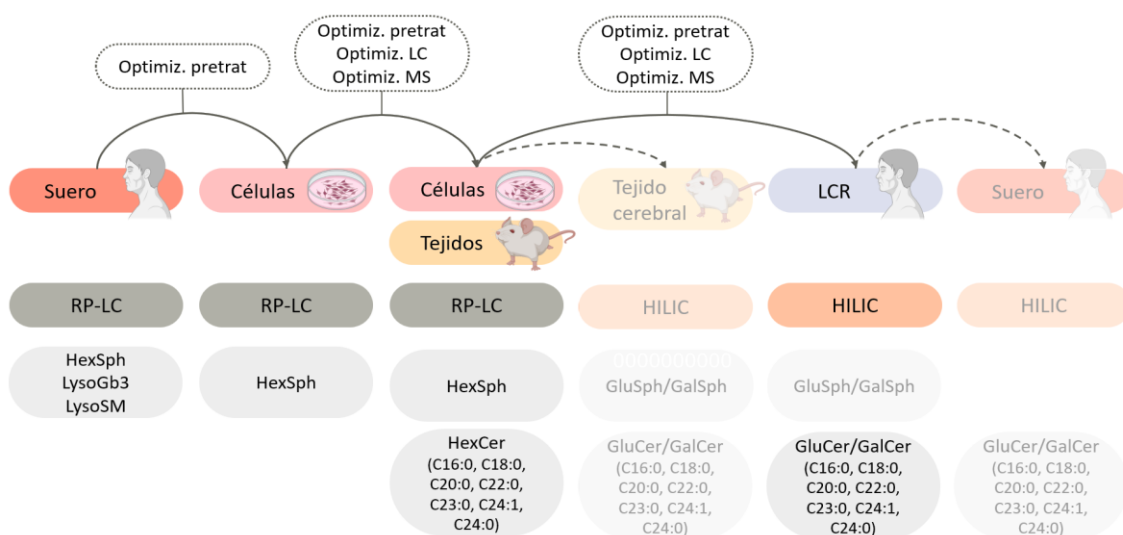


Figura 42. Esquema de la optimización secuencial de los métodos LC-MS/MS desarrollados para la línea EP-GBA, partiendo del método asistencial *in-house* para la cuantificación de esfingolípidos en suero de pacientes de nuestro centro. *RP-LC*: cromatografía líquida en fase reversa; *HILIC* cromatografía líquida de interacción hidrofílica. Las regiones atenuadas y líneas discontinuas indican los métodos que están en fases de desarrollo.

8.1.1. Principales consideraciones en su desarrollo y monitorización.

8.1.1.1. Curva de calibración. El rango lineal de las curvas se ajustó para abarcar la cuantificación de HexSph y HexCer en diferentes grupos (WT, HO, HZ, KO), y tipos de

matriz (homogenados celulares y tejido), con el objetivo de optimizar el uso de recursos y reducir la carga técnica, dado el elevado volumen de muestras.

Las curvas de HexSph mostraron una imprecisión interserie aceptable, con un LoQ de 0,0275 pmol. Para las isoformas, la imprecisión fue inferior al 20% para concentraciones superiores a 0,4 pmol, lo que indicó un buen ajuste en ese intervalo de medida, y garantizó cuantificaciones robustas, dado que todas las muestras analizadas presentaron concentraciones por encima de este límite (Tabla 11). No obstante, las curvas se construyeron en ausencia de matriz nativa y sin someterse a los mismos pretratamientos aplicados a las muestras, lo que podría conducir a sesgos en la cuantificación, al no reflejar adecuadamente los efectos de la propia matriz biológica, ni las posibles pérdidas de analito durante la extracción. La construcción de curvas en la matriz nativa permitiría minimizar estos sesgos.

La falta de matriz nativa o subrogada se debió principalmente a limitaciones en su obtención, recursos y tiempo. Esta estrategia presenta limitaciones prácticas, ya que requiere un gran número de pellets WT para preparar un pool, y en el caso de analitos endógenos, un volumen aún mayor para, idealmente, deplecionar la matriz. Alternativamente, restar la señal basal del blanco a los puntos de calibración podría no ser suficiente para discriminar concentraciones bajas entre grupos. Algunos estudios similares han construido las curvas en matriz biológica humana [171] o en matrices derivadas de modelos animales o celulares [248], y aunque no es la práctica más habitual, constituye la estrategia más adecuada.

En el caso del suero de ratón, no se construyó una curva específica en esa matriz, dado que las concentraciones observadas estaban dentro del intervalo del método asistencial previamente validado en suero deplecionado humano. Obtener un volumen suficiente para la construcción de una curva específica en su matriz habría requerido el sacrificio de un número elevado de animales; no obstante, cabe señalar que otras publicaciones han recurrido a matrices subrogadas para evitar esta opción [186]. En cualquier caso, sería recomendable realizar estudios de equivalencia para descartar posibles efectos de matriz.

Por otro lado, además de aplicar el mismo procedimiento de extracción que en las muestras, podrían introducirse modificaciones en los protocolos de pretratamiento para

reducir la variabilidad asociada. En las células, el solvente con IS se añadió directamente al pellet antes de la sonicación, a diferencia del tejido, donde la homogeneización previa se realiza con agua. Una alternativa sería dividir el pretratamiento celular en dos etapas, reproduciendo la secuencia aplicada en tejido. Estas modificaciones, junto con ajustes en la construcción de curvas, contribuirían a reforzar la armonización y robustez de los métodos.

8.1.1.2. Monitorización analítica: controles de calidad internos y factores de normalización. Los QC, preparados a partir de un pool de leucocitos sonicados, se emplearon para generar un factor de normalización específico de cada serie, que se aplicó tanto a la corrección de los propios QC como a las concentraciones calculadas de las muestras. La magnitud de dichos factores de corrección obtenidos, cercano a 1 para HexSph y superiores o inferiores a 1 dependiendo de la isoforma (Tabla 12), podría reflejar los sesgos derivados de las diferencias entre la matriz utilizada para la curva y la matriz biológica utilizada en los QC (eficiencias de ionización y de extracción). La variabilidad de dichos efectos entre series se evidenció en la dispersión de los factores, mayores en el caso de las isoformas.

La aplicación del factor puede compensar parcialmente estos sesgos en la cuantificación de los QC; sin embargo, no garantiza que dicha corrección sea adecuada para las muestras, especialmente en aquellas con una matriz distinta, como las derivadas de modelos celulares neuronales o de diferentes tejidos. Además, debe considerarse que los pool de leucocitos pueden contener concentraciones endógenas desconocidas de analitos, lo que también puede introducir sesgos en la cuantificación del QC y, por tanto, en el factor obtenido, que se aplica a las muestras. De igual forma, es posible que los CV interserie de los QC corregidos, que reflejarían la imprecisión residual atribuible al pretratamiento (pipeteo, variabilidad en la eficiencia de extracción) y al instrumento, no representen la imprecisión asociada a las muestras con distinta matriz.

En este contexto, sería recomendable preparar tanto las curvas de calibración como los QC en matrices equivalentes a las nativas, e incorporar, siempre que sea posible, análogos deuterados específicos para cada compuesto, con el fin de compensar estos efectos y mejorar la veracidad en la cuantificación. De igual forma, y dada la complejidad

de las matrices y de los analitos, resultaría conveniente realizar estudios de efecto matriz y recuperación, así como evaluar la selectividad y la posible presencia de interferencias.

A pesar de las limitaciones metodológicas descritas, estos métodos han resultado útiles para su propósito principal: la comparación exploratoria entre grupos de muestras, con distintas mutaciones y/o protocolos de tratamiento. Los resultados obtenidos han contribuido a establecer una base sólida tanto en los aspectos metodológicos como en su aplicación preclínica, como se discute a continuación.

8.1.2. Resultados obtenidos en su aplicación preclínica.

Los resultados obtenidos con estos métodos han sido consistentes con aquellos descritos previamente en modelos *in vitro* e *in vivo* [79,80,163,249], donde se documentan alteraciones de HexCer y HexSph tanto en modelos celulares homocigotos o heterocigotos, como en modelos animales en distintos tejidos periféricos y centrales, especialmente en homocigosis. Estos hallazgos evidencian que el grado de acumulación depende del tipo de alteración genética y del modelo considerado, lo que subraya la importancia de validar los biomarcadores en diferentes niveles experimentales antes de su traslación clínica.

Con estas aplicaciones, se caracterizó que las diferencias se acentuaban en la fracción lisosomal [78] (Figura 24), lo que sugiere que ciertos cambios lipídicos podrían expresarse de forma localizada a nivel de célula o subcompartimento específicos, un aspecto relevante para la interpretación de resultados en matrices complejas, como homogenados de tejido [26]. Además, en el caso de los modelos animales y muestras humanas, la acumulación de esfingolípidos se ve modulada por otros factores más complejos, incluidos los ambientales [83].

El modelo murino D409V, ya empleado en otros estudios [82,86], pudo caracterizarse con los métodos descritos. La consistencia entre el compartimento central (VMB) y periférico (suero) (Figura 25) apuntó a que la cuantificación de esfingolípidos podía reflejar de manera fiable la alteración enzimática. En heterocigotos, los cambios fueron intermedios respecto al WT y homocigoto, lo que apoyó la validez del modelo para

representar distintos grados de deficiencia enzimática. Posteriormente, este modelo se empleó en estudios traslacionales para evaluar terapias en desarrollo, en el marco de colaboraciones con el Grupo de Enfermedades Neurodegenerativas del VHIR, incluyendo las chaperonas moleculares para β -GCasa (subapartado 4.3.3) y nanoGBA como ERT (subapartado 4.3.4).

En el caso de las chaperonas alostéricas, tras 12 días de tratamiento *in vivo*, no se detectó un incremento en la actividad enzimática 24 horas después de la última dosis (Figura 27). Sin embargo, la disminución de los HexCer y HexSph en VMB y órganos periféricos confirmó un efecto terapéutico medible. De manera similar, con nanoGBA, tampoco se observaron incrementos de actividad enzimática a los 7 días de tratamiento, pero sí una reducción sostenida de HexSph en tejidos periféricos y en suero, superior a la obtenida con ERT convencional (Figura 29).

Para validar la eficacia terapéutica es fundamental contar con *readouts* fiables. En este sentido, la concentración de sustratos y derivados ofreció una medida más representativa de la modulación de la actividad enzimática, cuyo incremento suele ser transitorio y, por tanto, difícil de determinar, mientras que la reducción del acúmulo de sustratos reflejó el efecto sostenido del tratamiento.

En conjunto, este desarrollo ha contribuido a avanzar en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos asociados a *GBA1*, evaluar posibles aproximaciones terapéuticas y, en general, reforzar su aplicabilidad y establecer una base experimental sólida para su transferencia clínica.

8.2. IMPACTO DE LA VARIABILIDAD EXTRA-ANALÍTICA Y ANALÍTICA EN ESTUDIOS CLÍNICOS

Las diferencias en los resultados publicados hasta la fecha en estudios clínicos (Tablas 5-7) pueden atribuirse a múltiples factores extra-analíticos relacionados con el diseño experimental, entre ellos la heterogeneidad de las muestras empleadas, el tamaño limitado y las características de las cohortes (estados de progresión, severidad, criterios de inclusión/exclusión, edad), o la diversidad genética en *GBA1* y otros genes implicados en ALP. Además, hay que añadir la falta de armonización metodológica en aspectos como los protocolos de pretratamiento, los materiales de calibración, y las condiciones instrumentales. En conjunto, todos estos elementos deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos en muestras humanas.

8.2.1. Variables extra-analíticas.

El tipo de muestra constituye un factor determinante en la detección de la disfunción. Algunas alteraciones relevantes podrían ser menos evidentes fuera de compartimentos o fluidos biológicos específicos [26,78]. En tejido cerebral humano, se han analizado diferentes regiones, algunas asociadas a patología de Lewy, como la sustancia nigra, y otras no, como el cerebelo, lo que condiciona los cambios observados (Figura 43).

Otro factor que contribuye a la variabilidad observada es la heterogeneidad de las cohortes. Genéticamente, las variantes en *GBA1* presentan frecuencias distintas según la población [64,65,250] y difieren en su impacto funcional sobre la actividad enzimática. Aunque algunos estudios han relacionado la gravedad de la mutación con las alteraciones lipídicas resultantes, habiendo mayor acúmulo en variantes consideradas más severas [55,147,151], esta información no siempre se reporta en trabajos donde se cuantifican GSL, limitando su interpretación. En una cohorte española de más de 1000 pacientes, las mutaciones más frecuentes se encontraron en *LRRK2* (37,9%), *GBA1* (18%)

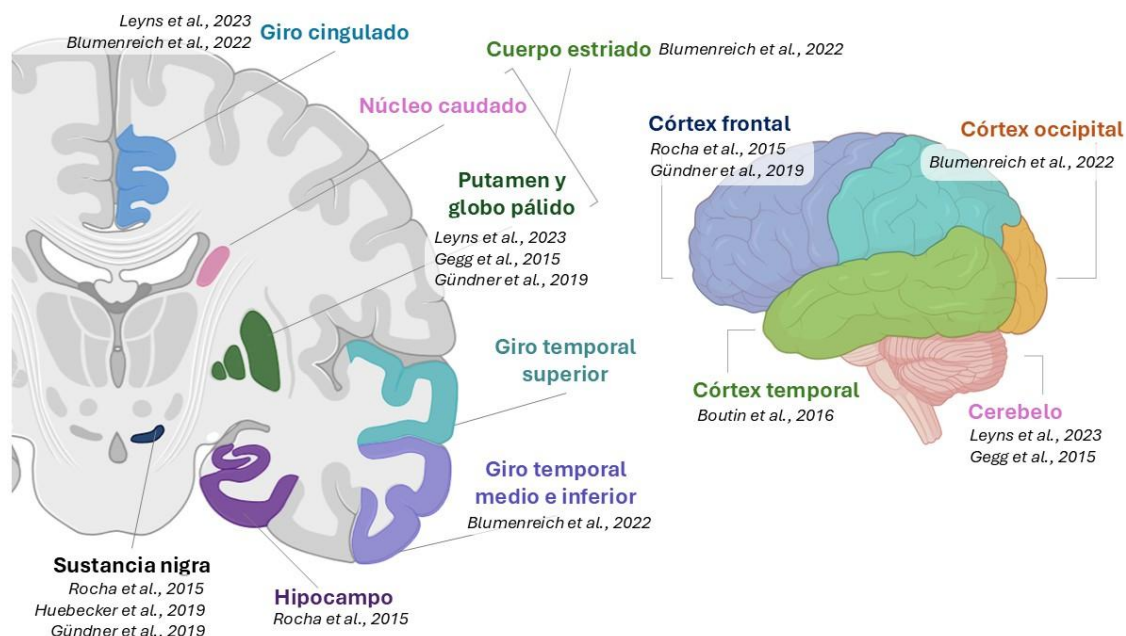


Figura 43. Regiones del cerebro humano que han sido objeto de estudio en la cuantificación de esfingolípidos en el contexto de EP-GBA. La región cerebral es solo una de las variables que pueden afectar los resultados; algunas zonas están vinculadas con patología de Lewy y Párkinson, mientras que otras no, como el cerebelo. Se incluyen: giro cingulado [91,170], estriado [170], putamen [91,139,142], giro temporal medio [170], hipocampo [93], corteza occipital [170], corteza temporal [171], corteza frontal [93,142], sustancia nigra [93,142,143], cerebelo [91,139]. En la Tabla 6 se muestra un resumen de la información observada para cada estudio.

y *PRKN* (18%); entre los portadores de *GBA1*, el 43% presentaban variantes severas y el 57% variantes leves. El 13,5% de los pacientes presentaron variantes patogénicas en genes como *PINK1*, *SMPD1*, *VPS13A6* o *ATP13A2*, entre otros [73], lo que indica que en pacientes con EP, aunque no presenten mutaciones en *GBA1*, conviene considerar la posible influencia de variantes en otros genes implicados en la ALP. En esta línea, en nuestra cohorte (Tabla 26) también se identificaron perfiles genéticos heterogéneos. Dentro del grupo EP-GBA, se observaron variantes de riesgo (E326K), mutaciones leves (Y205C) y mutaciones severas (V15Ter, D409H/T369M) para *GBA1*. Asimismo, en el grupo EPi se detectaron dos pacientes con variantes en *ATP13A2*, gen lisosomal asociado a EP que, de forma *GBA*-independiente, puede contribuir a la disfunción lisosomal y, en consecuencia, afectar a la actividad de la β -GCasa o a las concentraciones de su sustrato. Por último, con la edad, se ha descrito una disminución progresiva de la actividad β -GCasa y del metabolismo lipídico. Las diferencias en actividad enzimática y niveles plasmáticos de GluSph entre pacientes y controles tienden a atenuarse, lo que sugiere un posible efecto modulador del envejecimiento sobre estas alteraciones [93,146]. En

nuestra cohorte, la media de edad del grupo EP-GBA fue ligeramente superior, lo que podría introducir un sesgo en la interpretación. No obstante, el tamaño limitado de la muestra no permitió formar subgrupos por edad lo suficientemente robustos para evaluar estas variables de forma concluyente.

Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar, siempre que sea posible, variables como la edad, el genotipo y el tipo de muestra en el diseño experimental, ya que su omisión puede limitar la detección de asociaciones significativas o dificultar la interpretación de los resultados.

8.2.2. Variables analíticas.

Por otro lado, las discrepancias observadas entre estudios publicados sobre esfingolípidos en muestras humanas en el contexto de la EP pueden atribuirse, al menos en parte, a la ausencia de estandarización en los procedimientos analíticos empleados [158]. Esta variabilidad metodológica limita la obtención de datos comparables y reproducibles entre estudios. Muchos trabajos no describen adecuadamente los métodos de cuantificación ni sus características analíticas, lo que limita la reproducibilidad de los resultados. Un ejemplo ilustrativo es el reanálisis realizado por Lerche et al. [174], cuyos resultados fueron discordantes respecto a su estudio previo [151]. Los autores atribuyen parte de estas diferencias a aspectos metodológicos, destacando que el estudio original se basó en una aproximación semicuantitativa de lipidómica no dirigida (aunque no definida como tal en el apartado de Métodos), mientras que el estudio posterior empleó un enfoque dirigido con cuantificación específica de GluCer d18:1/C18:0.

Además de la variabilidad dentro de las condiciones empleadas en los métodos basados en LC-MS/MS, otros estudios cuantifican con técnicas alternativas, como la NP-LC acoplada a detector de fluorescencia [143,165]. Esta estrategia presenta una digestión enzimática específica de glucosa y oligosacáridos; sin embargo, no permite la distinción entre isoformas. Esto es relevante ya que algunas isoformas de cadena más larga, como C22:0, C23:0 y C24:0, han resultado particularmente informativas en estudios anteriores

[139,151,166,171,173], en concordancia también con nuestras propias observaciones (Figura 41).

Otro aspecto que complica la interpretación de los resultados es el uso del término “GluCer” sin especificar si la metodología empleada permite distinguir entre los dos isómeros estructurales [82,163]. En distintas matrices biológicas, como plasma [167], DBS [147], fibroblastos [169], o modelos celulares [78,121], se ha demostrado la potencial utilidad de su análisis agrupado bajo el término “HexCer”. En el contexto del diagnóstico diferencial de enfermedades de depósito, separar GluSph de GalSph en plasma no se considera obligatorio [251], dado que las entidades clínicas asociadas, EG y enfermedad de Krabbe, no presentan manifestaciones clínicas solapadas dentro del algoritmo diagnóstico diferencial. Sin embargo, la abundancia relativa de galactosa en el LCR [41,158] y el valor añadido descrito en estudios previos [171,181], dos aspectos que hemos observado en nuestros datos (Figura 32, Tabla 27), justifican su inclusión en el análisis, aún cuando en otras matrices biológicas esta diferenciación no se considere crítica.

Por último, la heterogeneidad en la presentación de los resultados, ya sea en términos de concentración molar [151,166,173,174], concentraciones de masa [151,175], o a valores normalizados a la cantidad de proteína total [78,121,139,143], tejido [79,171], o respecto a otros lípidos [171,172], dificulta la comparación de resultados entre estudios.

La Figura 44 muestra un esquema que resume los factores discutidos en este apartado.

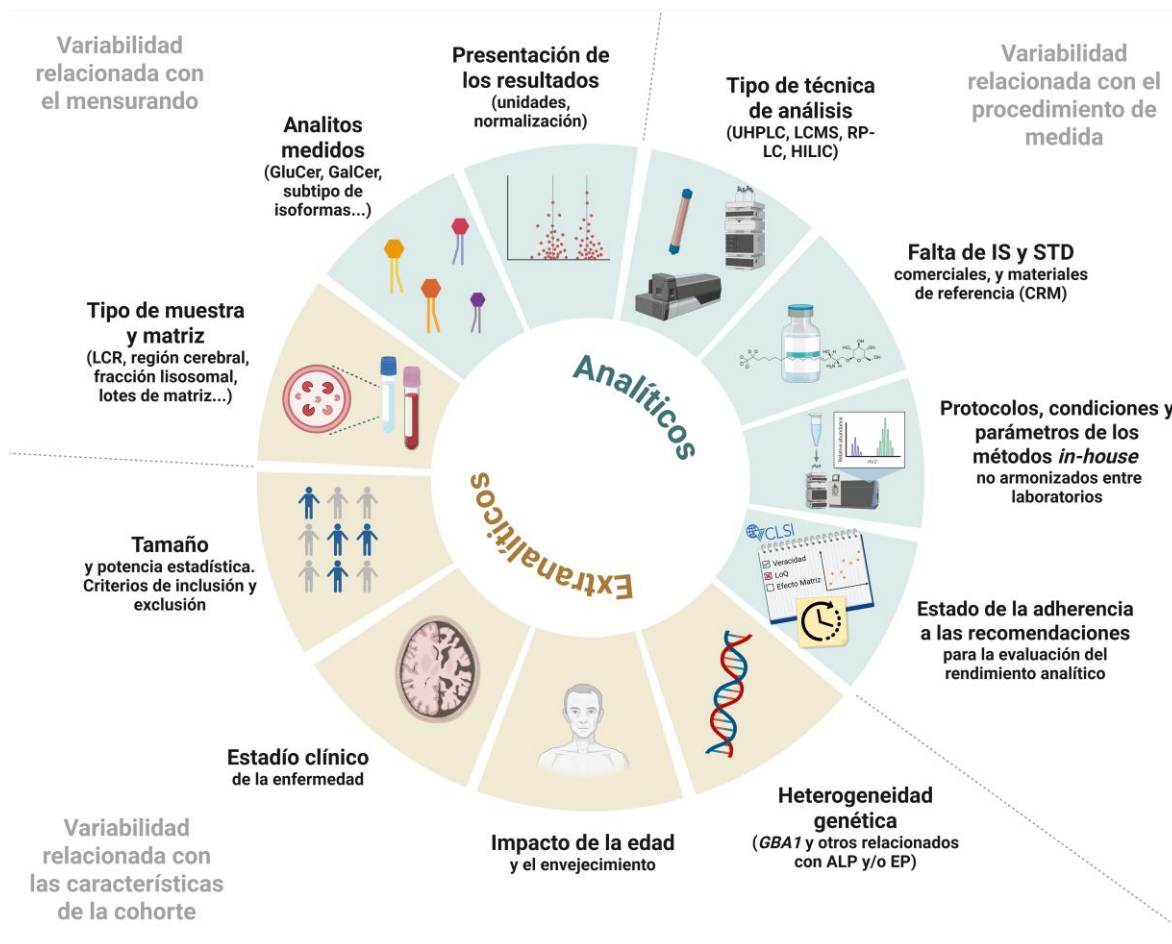


Figura 44. Principales fuentes de variabilidad que influyen en la cuantificación e interpretación de los resultados de esfingolípidos en estudios clínicos de EP-GBA. Se incluyen factores asociados al tipo de analitos medidos y muestras utilizadas, las técnicas y condiciones analíticas, así como elementos propios de la cohorte en estudio. Creada con <https://BioRender.com>.

8.3. EVALUACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DE GLUCER Y GALTER EN LCR

La variabilidad analítica condiciona directamente la capacidad del método para discriminar entre grupos clínicos; es fundamental que los resultados observados reflejen variaciones biológicas reales y no artefactos introducidos por el propio análisis. En este sentido, el uso de métodos validados permite interpretar los resultados de forma fiable para valorar la aplicabilidad clínica de un biomarcador.

La información metodológica disponible en los estudios publicados es, por lo general, limitada, y aquellos que incluyen evaluaciones de sus métodos lo hacen de forma parcial. Entre ellos, cabe destacar el estudio de Hamler et al. [79], quien reporta precisión, veracidad, linealidad, estabilidad y efecto matriz, y el de Boutin et al. [171], que incorpora además eficiencia de recuperación y determinación del LoQ. No obstante, en ambos casos, las especificaciones utilizadas son menos exigentes que las recomendadas por las guías internacionales, con un menor número de réplicas y niveles de QC, evaluación de un único estándar, una estimación del LoQ basada en la señal del blanco y la ausencia de una descripción detallada del estudio de efecto matriz, si este se menciona. El estudio de Matsumoto et al. [175], por su parte, establece la imprecisión y veracidad del método a partir de un mayor número de réplicas y niveles de QC, incluyendo la definición del LoQ conforme a estos criterios. Sin embargo, el efecto matriz es calculado a una única concentración mediante la evaluación del IS, sin utilizar ratios área analito/IS ni comprobar la variabilidad entre diferentes lotes de matriz.

En este trabajo, se llevó a cabo la evaluación de los siguientes parámetros del método desarrollado para cuantificar las isoformas de GluCer y GalCer en LCR: linealidad, LoQ, precisión, veracidad, selectividad, estabilidad del analito en la muestra, arrastre, efecto matriz y eficiencia de recuperación. La validación se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la CLSI y la EMA para la validación de métodos bioanalíticos. A continuación, se discuten los aspectos más relevantes derivados de esta evaluación.

8.3.1. Separación cromatográfica.

Los métodos HILIC permiten la separación de isómeros, pero típicamente requieren tiempos de cromatografía más largos [186]. Por ello, aunque nuestro método logró la elución de los 14 analitos en LCR en 4 minutos, fue esencial un reequilibrado hasta un tiempo total de 8 minutos para obtener resultados consistentes. La columna seleccionada fue HALO HILIC, que había sido utilizada en estudios previos [79,171,175]; sin embargo, existen otras columnas comerciales que podrían presentar buena resolución [186].

8.3.2. Linealidad y curva de calibración.

La curva de calibración y los QC se prepararon utilizando una matriz artificial de LCR (aLCR), ante la dificultad de obtener volúmenes suficientes de LCR nativo debido a las estrategias de depleción requeridas. Para reducir el volumen de LCR necesario, también preparamos curvas de calibración por dilución seriada, asegurando la equivalencia previa con la preparación mediante la adición de estándares independientes.

Cuando se utilizan matrices subrogadas, sintética comercial o de preparación propia, para preparar calibradores y QC, es esencial verificar su intercambiabilidad con la matriz nativa, para confirmar que la matriz artificial permite una respuesta comparable y garantizar que los resultados reflejen la concentración real del analito en las muestras [185]. Sin embargo, la presencia de compuestos endógenos dificultó la generación de curvas robustas en el estudio de equivalencia, especialmente en el intervalo bajo, lo que, junto con las limitaciones de volumen, representa un desafío metodológico. En este sentido, se recomienda seleccionar lotes de nLCR con concentraciones endógenas mínimas para los compuestos de interés. Por ello, sólo se incluyó la comparación de la variabilidad de las áreas ratio a una concentración de 100 nM entre el aLCR y el nLCR, que sugirió que el aLCR era adecuado para cuantificar muestras de pacientes (Tabla 17). Esta variabilidad debe considerarse como una aproximación, e investigaciones futuras deben explorar la adición de más concentraciones estándar y la investigación de nuevas matrices nLCR. De forma complementaria, y como se discute más adelante en el estudio

del efecto matriz, se evaluó la variabilidad introducida por tres lotes adicionales de matriz nativa. Una posible propuesta futura sería integrar la matriz artificial como un lote adicional dentro del diseño experimental del efecto matriz, optimizando así el uso de recursos.

Por último, cabe destacar que la mayoría de estudios continúan utilizando un único estándar e IS para la cuantificación de múltiples isoformas [171,173,180]. Esta estrategia requiere recurrir a un mayor número de semicuantificaciones basadas en curvas estándar de otros compuestos, lo que puede comprometer la veracidad de los resultados. En caso de evaluarse el método, con un estándar inevitablemente se limita el estudio de aspectos relevantes como el impacto en la eficiencia de la ionización, la recuperación, o las interferencias entre isoformas e isómeros, entre otros.

8.3.3. Límite de blanco, límite de detección y límite de cuantificación.

Existen distintas estrategias para estimar la capacidad de detección de un método, entre ellas la relación S/N, y la desviación estándar de la respuesta del blanco o de la ordenada en el origen de la curva, tal como se recoge en la ICH Q2(R2) [252], guía orientada a la validación analítica de procedimientos, no específicamente dirigida a bioanálisis. De hecho, la CLSI C62 únicamente recomienda la estimación del LoD en el contexto de métodos bioanalíticos LC-MS/MS como apoyo para la definición del LLMI. Varios autores han recopilado de forma exhaustiva las aproximaciones y recomendaciones que se establecen entre las principales guías [212,253,254].

En este estudio, el LoB y el LoD se estimaron siguiendo un protocolo adaptado de la CLSI EP17 [227], basado en las desviaciones estándar de mediciones de réplicas de muestras de blanco. El análisis se realizó en diferentes series analíticas para reflejar la variabilidad interdiaria, y aumentar la fiabilidad de su evaluación. Es importante considerar que factores como las características técnicas del detector MS, la eficiencia de recuperación de los analitos y los efectos de supresión iónica durante la ionización en la fuente pueden influir significativamente en el LoD y LoQ, los cuales podrían variar a lo largo del tiempo en función del estado del equipo.

Tanto el LoD como el LoQ cumplieron con las relaciones S/N recomendadas para esta aproximación, de 3:1 y 10:1, respectivamente [185,252] (Tabla 18). Además, el LoQ se validó en términos de precisión y veracidad entre series (Tabla 19), a diferencia de otros estudios en los que únicamente se calcula a partir de la ecuación basada en las desviaciones estándar de la señal blanco [171,189]. En nuestro caso, siguiendo esta aproximación, el LoQ podría haberse establecido entre 1,0 y 3,9 nM, dependiendo de la isoforma, pero dichos valores no cumplirían con los criterios de robustez requeridos. Las concentraciones de GluCer en LCR se sitúan cerca del límite inferior del intervalo de medida en varias isoformas y muestras, por lo que la ausencia de validación bajo criterios de precisión y veracidad puede comprometer la robustez de los resultados, y por tanto, a su interpretación clínica.

8.3.4. Precisión y veracidad.

La comparación con otros estudios ha sido limitada por la escasa información metodológica y de validación disponible. Entre las referencias más completas destaca el estudio de Boutin et al. [171], que analizó cinco isoformas de GluCer en términos de abundancia relativa. Sin embargo, la curva de calibración se construyó a partir del estándar comercial GalCer(C15:0), pudiéndose evaluar la precisión con muestras en algunos analitos endógenos, mientras que la veracidad únicamente pudo determinarse en dicho compuesto. En nuestro caso, se construyeron curvas de calibrado a partir de estándares comerciales de GluCer C16:0, GluCer C18:0, GluCer C24:1 y GalCer C24:1, lo que permitió validar de forma individual la veracidad y la precisión de cada una de estas isoformas.

8.3.5. Selectividad.

La selectividad es uno de los parámetros menos evaluados de forma sistemática, pese a su relevancia en el análisis de isoformas e isómeros estructurales. Su evaluación requiere considerar distintos enfoques para identificar posibles interferencias derivadas de la matriz o de los estándares empleados. Durante la validación, los TR de los compuestos

puros coincidieron con los observados en muestras de LCR, con una variación dentro del $\pm 2,5$ %, lo que confirmó la identidad de dichos analitos. Sin embargo, sería de interés poder confirmar la identidad de aquellas isoformas para las que no se dispone de estándar comercial. La isoforma C23:0 se incluyó en el perfil en base a estudios previos [79,151,173,181], aunque no había sido considerada en otros trabajos [166,171]. Actualmente ya hay estándar disponible comercialmente, por lo que en futuros estudios podría descartarse la posibilidad de que se trate de otra estructura, como C22:0 metilado (C22:0)Me, cuya elucidación estructural mediante MS/MS ha sido previamente descrita para globotriaosilceramida y galabiosilceramida [255–257].

La evaluación de la interferencia entre canales en el análisis por MS/MS no evidenció *cross-talk* con la transición ficticia (Figura 33), y la contribución individual de cada estándar, así como del IS, a las señales de los canales MRM restantes fue despreciable (≤ 1 %) en todos los casos, excepto en la transición correspondiente a C24:0, donde se detectó una señal inferior al 8 % tras la inyección de C24:1 (Tabla 20). La falta de estándar comercial de C24:0 impidió confirmar su impacto en la cuantificación. Esta interferencia podría deberse a un solapamiento isobárico por isótopos naturales (posiblemente de C24:1 con dos átomos de ^{13}C [194]) o a trazas residuales del estándar, ya sea por el grado de pureza de fábrica o por inestabilidad del stock. Futuras investigaciones podrían abordar esta cuestión monitorizando transiciones adicionales de posibles impurezas, aductos o isoformas similares. Algunos estudios incluyen otras isoformas insaturadas (C22:1, C23:1, C25:1, C26:1), aunque sin reportar validación al respecto [166,167,173,181].

8.4. ESTUDIO INTEGRAL DEL EFECTO MATRIZ

En este estudio, se integraron las recomendaciones de las principales guías de validación bioanalítica [177,185,209,210,242], junto con otros estudios de referencia relevantes en este campo [213,234] en un único diseño experimental y flujo de trabajo. El volumen limitado del LCR y la complejidad estructural de las isoformas endógenas de GluCer proporcionaron un entorno práctico para abordar los retos del diseño experimental y evaluar de manera integrada la información proporcionada por estos enfoques.

8.4.1. Primera estrategia.

Esta estrategia examinó la variabilidad de las áreas y áreas ratio entre diferentes lotes de matriz para evaluar la influencia del sistema analítico, los efectos relativos de la matriz y la recuperación en la precisión del método.

8.4.1.1. Variación de las áreas absolutas. Impacto en la eficiencia de ionización y recuperación en la precisión del método. Se esperaba que la variabilidad de las áreas absolutas aumentara progresivamente del set 1 al set 3, ya que en cada uno se introducía, de forma acumulativa, uno de los principales factores de variabilidad: el sistema analítico, el efecto matriz y la recuperación. Esta hipótesis, respaldada por estudios previos [213], se vio reflejada en nuestros resultados (Tabla 22A). El incremento de los CV en las áreas absolutas del set 3 respecto al set 2 fue claramente mayor que el observado entre el set 2 y el set 1, lo que sugirió que la recuperación entre lotes introducía una variabilidad más significativa que la atribuible al efecto matriz.

8.4.1.2. Variación de las áreas ratio y las pendientes, y compensación del IS.

Variación en áreas ratio. Asimismo, se esperaba que los CV obtenidos a partir de las áreas ratio fueran menores que los correspondientes a las áreas absolutas, reflejando la capacidad del IS para compensar parte de la variabilidad introducida en los estándares (Tabla 22B). En el set 2, los CV de las áreas ratio fueron efectivamente algo menores en

todos los compuestos y concentraciones, lo que indicó que el IS logró atenuar parcialmente la variabilidad derivada del sistema analítico y del efecto matriz. Esta reducción fue aún más pronunciada en el set 3, coincidiendo con una correlación positiva entre las señales del estándar y del IS (Figura 38), lo que sugirió que el IS también ayudó a corregir la variabilidad asociada a la recuperación. Sin embargo, se observó una excepción en el set 1 a 50 nM, donde los CV de las áreas ratio superaron a los de las áreas absolutas; además, algunos CV del set 1 fueron superiores a los del set 2. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las adaptaciones realizadas en los protocolos experimentales debido a la limitación de volumen de muestra, que condicionaron el diseño de cada set. En los sets 1 y 2, las soluciones $WS(STD)_{ME}$ y $WS(IS)_{ME}$ se prepararon por separado; en cambio, en el set 3 se empleó una única solución mixta que contenía todos los compuestos, incluido el IS, con el fin de minimizar el volumen sin alterar significativamente la composición de la matriz. Además, el set 2 se diseñó con un volumen de extracto más reducido, también con el objetivo de limitar el volumen total de LCR requerido. Ambas adaptaciones pudieron influir en los resultados, bien por la introducción de variabilidad asociada a errores de pipeteo [243], o bien por posibles diferencias en las interacciones entre analitos, matriz y fase móvil durante su preparación. Cabe recordar que el solvente puro también actúa como matriz y puede afectar al comportamiento analítico [238,243]. En matrices más accesibles, como el plasma, sería conveniente preparar los sets de forma más consistente, minimizando así la variabilidad asociada a estos factores.

En el set 3, los CV de las áreas absolutas fueron claramente distintos entre concentraciones, lo que indicó una posible relación entre la concentración del analito y la variabilidad de la recuperación entre lotes. A concentraciones más altas, la cantidad recuperada fue más variable, una tendencia ya descrita en la literatura [258]. Sin embargo, esta dependencia de la concentración no se observó en las áreas ratio, cuyos CV fueron similares en ambas concentraciones, indicando que el patrón de variación fue compartido por los estándares y el IS. En este contexto, la variabilidad observada en las áreas ratio del set 3 constituye una estimación directa de la precisión intraserie global del método, incluyendo la variabilidad entre lotes de matriz. Este tipo de variabilidad no suele contemplarse en las guías internacionales de validación, que se centran en la evaluación interserie, considerando fuentes de variación como las calibraciones, el

operador o las condiciones ambientales. Sin embargo, su inclusión puede aportar una visión más completa de la precisión del método en condiciones reales de aplicación.

Variación en pendientes. Por último, la mayor variabilidad observada en las pendientes estimadas (Tabla 23) en comparación con las área ratio a cada concentración (Tabla 22B) pudo ser debido a que se generaron a partir de dos concentraciones, dada la limitación de volumen. Aunque un mayor número de puntos de calibración podría haber reducido esta variabilidad, la presencia de señal atribuida a analitos endógenos dificultó la construcción de curvas fiables a bajas concentraciones. Esta limitación ha sido descrita por otros autores, que no recomiendan esta evaluación especialmente cuando no se dispone de una matriz blanco [223] o cuando la concentración del estándar añadido es baja en relación con el contenido endógeno del analito [243]. Si bien algunos autores han propuesto el uso del CV de las pendientes entre lotes como indicador más representativo del efecto matriz relativo y de la precisión global [235,237], los resultados de nuestro estudio deben interpretarse como una aproximación. Aun así, la precisión observada se mantuvo por debajo del 15%, lo que se consideró aceptable.

La tendencia decreciente observada en los CV entre sets, con los valores más bajos registrados en el set 3, tanto para áreas ratio (hasta 6,1 %) como para pendientes (hasta 12,6 %), respalda la utilidad del IS para compensar la variabilidad introducida a lo largo del proceso analítico, contribuyendo así a una mejora en la precisión del método.

8.4.2. Segunda estrategia.

Esta estrategia evaluó la influencia de la precisión global del proceso en la cuantificación del analito.

Aunque las pendientes presentaron una mayor variabilidad que las áreas ratio, esta diferencia no tuvo un impacto relevante en la cuantificación. Al emplear las dos pendientes más divergentes entre sí para calcular las concentraciones, la desviación respecto al valor nominal fue inferior al 10% en todos los estándares y concentraciones analizados (Tabla 24).

No obstante, tanto la variabilidad observada como las desviaciones calculadas deben interpretarse como estimaciones aproximadas, ya que en este estudio se basaron en curvas de calibración construidas únicamente con dos niveles de concentración.

Cabe señalar que el cálculo de la desviación porcentual respecto a la concentración nominal se ajusta a las recomendaciones de la EMA [209] y al planteamiento de Matuszewski et al. [213]. Sin embargo, una estrategia alternativa, más representativa de la influencia de la precisión global en la cuantificación del analito, consiste en calcular las concentraciones a partir de las dos curvas de calibración correspondientes a los lotes con mayor diferencia de pendiente, aplicando a ambas las área ratios de un lote restante, y determinando posteriormente la desviación porcentual entre las concentraciones resultantes, en lugar de compararlas con un valor nominal. Este enfoque se basa en el concepto introducido por Matuszewski [234] en 2006, quien sugirió que la máxima diferencia entre las pendientes puede considerarse un indicador de la mayor variación esperada en la concentración del analito entre lotes, causada por el efecto relativo de la matriz (es decir, variaciones en las eficiencias de ionización y recuperación). Estudios futuros deberían explorar la contribución de la ordenada en el origen, además de la variabilidad de la pendiente, a estas diferencias a lo largo del intervalo evaluado.

8.4.3. Tercera estrategia.

Esta estrategia permitió calcular tanto los valores absolutos y relativos del efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso, como sus correspondientes factores normalizados mediante IS, con el fin de evaluar en qué medida este compensa tanto los efectos absolutos de la ionización y de recuperación como la variación de dichos efectos entre los distintos lotes.

8.4.3.1. Impacto del efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso en el rendimiento del método: implicaciones en su desarrollo. Los resultados (Tabla 25) mostraron una supresión iónica más intensa en el IS que en los estándares, como indicaron los valores de MEF superiores a 1. Esta diferencia podría deberse a la coelución

de otros componentes de la matriz, que compiten por la ionización [221], o bien a una coelución parcial entre analitos, ya que se observó cierto solapamiento en las áreas de algunos picos cromatográficos, lo que podría haber provocado supresión iónica mutua [258,259].

Si la interferencia de matriz afectase de forma significativa a los estándares, el uso de un estándar interno marcado con isótopos estables (SIL-IS) puede contribuir a mitigarla al experimentar una supresión iónica similar; no obstante, esta estrategia no evita la pérdida de señal asociada ni, por tanto, la reducción en la capacidad de detección del método [260], sino que mejora la robustez compensando su impacto en la cuantificación. En nuestro estudio, la mayor supresión se observó en el IS, lo que, en principio, no debería comprometer directamente al LoQ del método, ya que una concentración constante de IS es añadida a todas las muestras, calibradores y QC. No obstante, una reducción en su señal podría afectar a la robustez del método a concentraciones bajas [243], especialmente si el sistema instrumental no opera bajo condiciones óptimas, al incrementar la variabilidad en la normalización del analito.

Para mitigar este efecto, podrían introducirse modificaciones cromatográficas orientadas a mejorar la resolución de los picos y minimizar la coelución entre compuestos. Aunque esta estrategia puede resultar eficaz, también debe considerarse que la eficiencia de ionización está influida por la composición de la fase móvil. Por ello, si no se dispone de IS para cada compuesto, los cambios en la composición de la fase móvil durante la cromatografía de gradiente pueden influir en la eficiencia de ionización e introducir un posible sesgo en la cuantificación del analito.

Plantear una revisión del protocolo de pretratamiento podría ser otra opción, ya que la extracción lipídica constituye una etapa especialmente crítica en matrices como el LCR, donde las concentraciones de analitos son considerablemente bajas.

Los valores de RE obtenidos fueron bajos, lo que sugirió pérdidas significativas durante la extracción y, en consecuencia, una reducción de la PE, con probable impacto sobre el LoQ [212]. Por otro lado, el análisis de la relación entre ME y RE, representado mediante los diagramas de dispersión, mostró una tendencia negativa: en general, los lotes con mayor recuperación tendieron a presentar una supresión iónica más pronunciada, y viceversa (Figura 40). Esta relación podría deberse a que una mayor eficiencia de

extracción facilita también la coextracción de compuestos interferentes que compiten en el proceso de ionización.

La extracción LLE basada en MeOH/CHCl₃ está ampliamente considerada como un método de extracción eficiente [43,191,194,198,199,202,203], y ha sido ampliamente utilizado [139,151,167,172,173,179], pero otros autores han empleado SPE [79,171,174,175], o una combinación de ambas [180]. Durante la fase de desarrollo del método se ensayaron distintas condiciones de extracción LLE, en consonancia con los recursos disponibles, con el objetivo de maximizar la recuperación empleando el menor volumen de muestra posible. Bajo estos criterios, se seleccionó el procedimiento actual como la opción más adecuada. Aunque en un estudio [171] se describió una menor respuesta analítica al emplear LLE en comparación con SPE, las tasas de recuperación fueron comparables a las reportadas en SPE en dicho trabajo. Además, esta pérdida de señal fue atribuida a una supresión iónica más marcada y no a una posible reducción en la eficiencia de recuperación; sin embargo, no se evaluó de forma específica la eficiencia de ionización ni se presentaron datos comparativos de recuperación entre ambos procedimientos.

8.4.3.2. Impacto del efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso: capacidad compensatoria del IS. La recuperación del IS fue aproximadamente la mitad que la de los estándares, lo que indicó diferencias en la eficiencia de extracción. Como resultado, la PE del IS fue considerablemente inferior, con valores de PEF superiores a 2 (Tabla 25 y Figura 39). Es probable que el IS seleccionado difiera de los analitos de interés en términos de estructura química, propiedades fisicoquímicas, eficiencia de ionización y TR; estas diferencias pueden influir tanto en la recuperación como en la susceptibilidad al efecto matriz. Además, la estabilidad de los análogos marcados con deuterio puede ser limitada. Se han descrito fenómenos de intercambio isotópico durante la extracción, en la interfaz del MS, o en la fase gaseosa, lo que puede afectar la señal del IS deuterado y generar variabilidad en su respuesta [185,221]. Todo ello podría contribuir a que el IS y los estándares no se comporten de forma equivalente a lo largo del proceso analítico. Las guías internacionales [185,209,210] recomiendan el uso de IS marcados con isótopos estables (SIL-IS), priorizando aquellos que contienen ¹³C, ¹⁵N o ¹⁷O, y aceptando los

isótopos deuterados como alternativa cuando los anteriores no están disponibles. Estos se seleccionan basados en la similitud estructural con el analito para compartir propiedades fisicoquímicas, lo que garantiza TR y efectos de matriz similares [41]. En nuestro caso, la disponibilidad comercial limitada restringió las opciones, por lo que se optó por el uso de IS deuterados. Durante el desarrollo del método, se evaluaron distintas opciones comerciales (GluCer C18:0-d₅ y GluCer C17:0), sin observar mejoras en la reproducibilidad.

8.4.3.3. Variabilidad del efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso. Los valores de ME, RE y PE aportan información relevante sobre el rendimiento del método, pero su utilidad como indicadores de robustez depende de su variabilidad entre lotes. En nuestro estudio se observaron diferencias en la eficiencia de ionización y en la recuperación entre diferentes lotes de LCR (rME y rRE), siendo esta última considerablemente mayor. No obstante, tras la normalización con el IS, los CV disminuyeron de forma notable (Tabla 25), lo que sugirió que los patrones de variación fueron similares entre los estándares y el IS, y que este último contribuyó a compensar adecuadamente dichas fuentes de variabilidad.

Al igual que en la primera estrategia, se observó que, a concentraciones de 100 nM, los valores de rRE y rPE fueron más elevados que a 50 nM, indicando una posible relación dependiente de la concentración. Sin embargo, esta tendencia desapareció tras la normalización con el IS. En este sentido, los valores de rPEF se mantuvieron por debajo del 15%, cumpliendo con los criterios de aceptación definidos para este estudio. Estos resultados reforzaron la utilidad del IS para mejorar la precisión global del método, pese a la variabilidad observada en la recuperación.

Por último, es de interés revisar y comparar los resultados de la precisión desde las distintas perspectivas que se han abordado durante la evaluación del método. El estudio de precisión interserie (Tabla 19) incorporó la variabilidad interdiaria derivada de posibles fluctuaciones en los parámetros del sistema cromatográfico (como la temperatura, el pH, la composición del solvente o el estado de la columna), en las condiciones del MS (incluyendo la temperatura, la presión o la estabilidad de la fuente de ionización), así como la influencia de múltiples calibraciones y distintos

procedimientos de mantenimiento. Aunque en dicho estudio las muestras de QC se prepararon de forma independiente, la matriz empleada procedía de una única fuente (aLCR). En cambio, el estudio completo del efecto matriz se llevó a cabo en una única serie analítica, pero utilizando matrices procedentes de distintos orígenes de nLCR, lo que introdujo una fuente adicional de variabilidad. Dentro del estudio del efecto matriz, conviene distinguir que los CV calculados a partir de los valores de ME, RE y PE, así como de sus factores normalizados (rMEF, rREF, rPEF) en la tercera estrategia (Tabla 25), difieren de los obtenidos en la primer estrategia, a partir de las áreas absolutas y las áreas ratio (Tabla 22). Esta discrepancia puede atribuirse a que ambas reflejaron aspectos distintos del rendimiento analítico: mientras que los valores obtenidos a partir de las áreas y áreas ratio en los sets 1, 2 y 3 muestran la contribución acumulada de varios factores (sistema analítico, matriz, recuperación, respectivamente) a la precisión global, la tercera estrategia permite estimar la variabilidad de cada uno de estos procesos por separado. Además, como se ha descrito anteriormente [238], sus respectivos cálculos se basan en sets de datos diferentes: mientras que para la primer estrategia las áreas ratio pueden derivarse de un único set, en la tercera requiere comparar dos sets, lo que puede aumentar la variabilidad observada.

En conjunto, estas estrategias permiten una evaluación integral del efecto matriz y de la precisión global del método, facilitando la identificación de las causas subyacentes de la variabilidad en cada etapa, de acuerdo con las recomendaciones de las principales guías de validación bioanalítica.

8.5. HERRAMIENTAS TRANSFERIBLES PARA LA EVALUACIÓN DE MÉTODOS

8.5.1. La evaluación de métodos en el marco regulatorio actual.

La complejidad de los procedimientos de evaluación y las limitaciones de tiempo, recursos económicos, equipamiento o espacio dificultan que los especialistas de los laboratorios clínicos se adhieran a las recomendaciones establecidas en las guías para el desarrollo y validación de métodos bioanalíticos. Esta adherencia, además de ser deseable, se convierte en un requisito en el contexto de la próxima implementación del EU IVDR 2017/746 [178]. En este marco, demostrar la validez de un método *in-house*, o LDT, implica evidenciar su veracidad y reproducibilidad analítica [261]. A pesar de que la orientación específica para su aplicación sigue siendo limitada [262,263], algunas publicaciones apuntan a que la conformidad con la norma ISO15189:2022 [264] podría ser suficiente para garantizar el cumplimiento de los parámetros analíticos recogidos en su Anexo 1 (incluyendo selectividad, interferencias, linealidad, efecto matriz, veracidad, recuperación, precisión, LoD, LoQ) [265]. En España la acreditación no es un requisito obligatorio [266], y en determinadas áreas del laboratorio clínico, especialmente aquellas dependientes de LDT, como las centradas en enfermedades minoritarias, este proceso puede implicar una inversión considerable en documentación y recursos [267].

El desarrollo de herramientas accesibles que permitan integrar y estandarizar estas evaluaciones favorece la aplicabilidad práctica en el laboratorio clínico y representa, por tanto, una vía para cumplir con las recomendaciones metodológicas y garantizar el rendimiento analítico exigido por la IVDR.

8.5.2. Integración en una herramienta de trabajo para la evaluación del efecto matriz.

A diferencia de otros parámetros de la validación bioanalítica, como la precisión o la linealidad, y pese a su impacto en la robustez del método, la evaluación del efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso carecen de protocolos detallados y de

criterios armonizados entre guías. La EMA, tras la adopción de ICH M10, aborda el efecto matriz desde una perspectiva de eficiencia global del proceso, exigiendo menos niveles de concentración y permitiendo el uso de un número limitado de lotes de matriz, lo que facilita su aplicación en entornos con recursos limitados. No obstante, esta estrategia no desglosa las contribuciones individuales de los principales factores, lo que dificulta identificar las causas subyacentes de la pérdida de rendimiento del método. Por su parte, la CLSI referencia el enfoque de Matuszewski et al. [213], que aborda de forma conjunta el efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso. Sin embargo, al igual que la EMA, no proporciona protocolos suficientemente detallados que guíen su implementación práctica. Además, no suelen considerar contextos como volúmenes limitados de matriz o presencia de analitos endógenos, frecuentes en el laboratorio clínico [211]. También difieren en la fase en la que se sitúa esta evaluación: mientras que la CLSI C62 la aborda durante la preverificación, antes de la validación completa, la EMA M10 la incluye en la validación general del método, lo que tiene implicaciones cuando los resultados no cumplen los criterios de aceptación y es necesario retroceder a fases previas de la optimización.

Estas diferencias pueden aportar información complementaria sobre los factores que afectan al rendimiento global del método; esto se evidencia en el flujo de trabajo propuesto para la integración de estrategias en la evaluación del efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso (Figura 36, Tabla 30). La variación de las áreas ratio en el set 3 (pre-extracción), en línea con Matuszewski et al. [213], o la variabilidad de las pendientes, tal como describe posteriormente el mismo autor [234], permiten evaluar la precisión global del proceso.

Asimismo, la desviación en las cuantificaciones obtenidas respecto al valor nominal ayudan a valorar la influencia de la precisión global en la cuantificación, en consonancia con la EMA M10 y Matuszewski et al. [213]. Por otro lado, la comparación de concentraciones obtenidas con ecuaciones de lotes diferentes ofrece una estimación más específica del impacto relativo de la matriz en la cuantificación [234].

Parámetros como el CV de las áreas en los sets 1 y 2, o los valores de ME y RE, son fundamentales para evaluar los factores que contribuyen a la precisión del método y el impacto de la eficiencia de ionización y la fracción de recuperación, respectivamente. El

cálculo de ME se recomienda en la CLSI C50 [177] y en la guía de la EMA de 2011 [242], ya desactualizada; mientras que la estimación de RE se incluye en la ICH M10 de 2022 (y por tanto en las guías EMA y FDA en vigor) [209], y en la guía previa de la FDA [210], aunque como experimentos independientes. Sin embargo, la robustez del método se comprende mejor a partir de la variabilidad de estos factores en diferentes lotes de matriz, en particular al normalizar por el IS, tal como señala la CLSI C62 [185].

Tabla 30. Alineamiento de las estrategias con las recomendaciones de las guías internacionales para evaluar el efecto matriz con muestras preparadas pre- y post-extracción.

Guía	Lotes (Conc.)	Recomendaciones	Estrategia
EMA 2011 [242]	6 (2)	Efecto matriz absoluto de STD e IS, añadido en matriz post-extracción vs solvente Factor de normalización por IS (MF) y CV entre lotes. Se pueden usar menos lotes en determinados casos.	<u>Tercera</u> (solo aplica para ME, MEF y rMEF)
FDA 2018 [210]	-	Recuperación, añadido en matriz pre-extracción vs matriz post-extracción.	<u>Tercera</u> (solo aplica a RE)
ICH M10 2022* [209]	6 (2) 3 replic	Efecto matriz, añadido en matriz pre-extracción (estudio de precisión y exactitud). Se pueden usar menos lotes en determinados casos. Recuperación, añadido en matriz pre-extracción vs matriz post-extracción.	<u>Primera</u> (considerando que se evalúa concentración y no áreas, y solo aplica a la precisión global del método o set 3) <u>Segunda</u> (considerando que utiliza curva validada y no ecuaciones obtenidas entre los lotes). <u>Tercera</u> (solo aplica a RE).
CLSI C62 2022 [185]	5 (7)	Efecto matriz absoluto añadido en matriz post-extracción vs solvente. Variabilidad de áreas ratio. Normalización del efecto matriz por IS. Refiere a Matuszewski et al. [213] y CLSI C50 [177] como mejores prácticas.	<u>Primera</u> (CV áreas ratio y por referencia a Matuszewski et al. [213]) <u>Tercera</u> (solo aplica a ME, MEF; considerar aproximación completa por su referencia a Matuszewski et al. [213])
CLSI C50 2007 [177]	5 (-)	Evaluación de efecto matriz absoluto (ME), eficiencia de la extracción (RE) y eficiencia del proceso (PE). Refiere a Matuszewski et al. [213] y Maurer et al. [268] como mejores prácticas.	<u>Primera</u> (por su referencia a Matuszewski et al. [213]) <u>Tercera</u> (solo aplica a ME, RE, PE, considerar aproximación completa por su referencia a Matuszewski et al. [213])

*ICH M10 actualmente respalda la guía más actualizada de la EMA (para la UE) y la FDA (para EE. UU.) sobre la validación de métodos bioanalíticos.

En conjunto, esta diversidad de enfoques evidencia la utilidad y necesidad de herramientas que permitan integrar y sistematizar las evaluaciones. En respuesta a esta necesidad, se desarrolló un flujo de trabajo que integra en un único esquema experimental las estrategias recomendadas por las principales guías de bioanálisis, acompañado de una herramienta Excel automatizada, de libre acceso, que facilita cálculos e interpretación de resultados. La herramienta es aplicable a otros analitos y su protocolo presenta una amplia utilidad en química analítica.

8.6. INTERPRETACIÓN Y SIGNIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS GSL

Clásicamente, la EP ha sido entendida como una proteinopatía en la que los lípidos contribuyen al proceso patológico de forma secundaria. Sin embargo, algunos autores [269] ya describen las sinucleinopatías como entidades simultáneamente *proteinopáticas* y *lipidopáticas*, en las que un círculo vicioso de dishomeostasis proteica y lipídica contribuye a la progresión de la enfermedad.

8.6.1. Perfil clínico y lipídico en la cohorte EP-GBA.

La mayoría de los pacientes con EP-GBA son portadores heterocigotos y conservan una actividad residual de β -GCasa, que puede alcanzar hasta un 50% [48]. Este nivel de actividad podría ser suficiente para evitar la acumulación detectable de GluCer, lo que explicaría la ausencia de alteraciones marcadas en algunos estudios [26]. Incluso en la EG, en la que la actividad enzimática suele reducirse al 10–20%, muchos pacientes no desarrollan EP [146]. Todo ello refuerza la idea de que la disfunción de β -GCasa actúa más como un factor de riesgo o de susceptibilidad que como un determinante patológico directo. Factores genéticos como la presencia de otras mutaciones que actúan como moduladores de GBA, u otros como la edad o la exposición ambiental podrían inducir una disfunción progresiva y favorecer la acumulación de sustratos [97].

A pesar de ello, la presencia de variantes en *GBA1* se ha relacionado con un perfil clínico y biológico específico dentro de la EP [74] (Tabla 3), y las diferencias observadas según la gravedad de la mutación podrían contribuir a definir subgrupos con distinto pronóstico [127,270]. En nuestra cohorte, los pacientes EP-GBA mostraron una edad de inicio ligeramente superior, mayor duración de la enfermedad y puntuaciones más elevadas en las escalas motoras (Hoehn & Yahr y MDS-UPDRS III) respecto al grupo EPi, mientras que las puntuaciones cognitivas (MoCA) fueron similares entre ambos grupos (Tabla 26).

En cuanto al perfil lipídico, en concordancia con estudios previos, GalCer presentó concentraciones superiores a las de GluCer en todos los grupos de pacientes, con

independencia del perfil clínico (Tabla 27). A pesar del reto analítico que supone su separación, por tratarse de estructuras estrechamente relacionadas, la inclusión de GalCer en el perfil analítico no sólo responde a una necesidad metodológica, sino de aplicación clínica, porque permite el cálculo del ratio GluCer/GalCer, cuya tendencia ascendente ha sido descrita en tejido cerebral en el contexto de la EP [171], y se ve respaldada por nuestros hallazgos en LCR. Mutoh et al. [181] describieron una reducción de GalCer y, con ello, un aumento relativo del cociente GluCer/GalCer en el LCR de pacientes con hidrocefalia normotensiva idiopática, un trastorno parkinsoniano. Otros ratios de normalización, como GluCer/SM, se han propuesto en LCR como marcador pronóstico en pacientes con EP idiopática y EP-GBA [172] .

En nuestra cohorte, se observaron tendencias al alza de GluCer/GalCer tanto entre grupos clínicos (Figura 41), como dentro del grupo EP-GBA entre pacientes con variantes severas frente a aquellos con variantes leves o de riesgo (Tabla 29).

El grupo de pacientes con EPI sin variantes en *GBA1* mostró medianas de ratios GluCer/GalCer más elevadas que los controles sanos, aunque inferiores a las observadas en el grupo EP-GBA. De forma exploratoria, los dos pacientes del grupo EPI portadores de variantes en el gen *ATP13A2* (PARK9) también presentaron una mediana de ratios superior al resto del grupo. Si bien estas observaciones deben interpretarse con cautela debido al tamaño limitado de la muestra, apuntan a que la cuantificación de GSL podría tener aplicaciones más amplias, más allá del contexto específico de los portadores de variantes en *GBA1*, y resultar de interés en el estudio de otras alteraciones genéticas vinculadas a la vía lisosomal o al metabolismo de esfingolípidos, muy frecuentes en EP [36]. Además, concuerdan con estudios previos que han descrito una reducción de la actividad de β -GCasa en pacientes sin variantes patogénicas en *GBA1* [140,146,149], así como con la existencia de una disfunción progresiva de la vía ALP incluso en ausencia de alteraciones genéticas conocidas [16,271].

Por otro lado, dado que se desconoce si cada isoforma contribuye de manera diferenciada a la fisiopatología de la EP, se considera relevante cuantificarlas de forma individual, ante la posibilidad de que alguna aporte información adicional. En este sentido, ciertas ratios específicas de isoformas individuales, como C22:0, C23:0 o C24:0, mostraron un especial interés en este estudio, en línea con observaciones previas

[139,151,166,171,173], al presentar medianas más elevadas en el grupo EP-GBA, especialmente en portadores de mutaciones severas.

Aunque las isoformas de GalCer no han sido evaluadas tan extensamente como las de GluCer, su inclusión en el análisis permite la separación cromatográfica de GluCer, facilitar la normalización de los resultados, y complementar el análisis de las concentraciones absolutas, favoreciendo así una evaluación más integral de los perfiles lipídicos en la EP.

8.6.2. Relación entre biomarcadores lipídicos y progresión clínica.

Aunque múltiples estudios longitudinales han evidenciado una progresión motora más rápida en EP-GBA [47,70,128] (Tabla 3), medida mediante escalas como MDS-UPDRS y Hoehn y Yahr, la relación en el caso de los esfingolípidos y las puntuaciones clínicas es limitada. Algunos estudios no han hallado una correlación significativa entre las pruebas clínicas y la concentración de esfingolípidos [166,174]. Al inicio del estudio de Huh 21 et al. [172] no observaron asociación entre los niveles de esfingolípidos y las puntuaciones MoCA en pacientes con EP idiopática, aunque sí en el grupo EP-GBA; sin embargo, en ambos grupos, aquellos pacientes en el cuartil más alto de GluCer/SM presentaron un empeoramiento cognitivo más acelerado a lo largo del tiempo. Por otro lado, Te Vrugte et al. [165] encontraron correlaciones con la escala MDS-UPDR III y otros GSL complejos, distintos a GluCer. En el presente estudio no se evaluaron correlaciones directas entre las concentraciones de GluCer o las ratios, y las escalas clínicas. No obstante, el grupo EP-GBA, que mostró la mediana de ratios más elevada, fue también el que presentó las puntuaciones más altas en MDS-UPDRS III y Hoehn & Yahr.

8.6.3. Consideraciones para la aplicabilidad clínica.

El tamaño reducido de las muestras en el presente estudio y en trabajos previos constituye una limitación importante que podría explicar la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre grupos. En aquellos estudios que incluyeron

cohortes más amplias, integradas en grandes iniciativas multicéntricas como la *Parkinson's Progression Markers Initiative* (PPMI), y que permitieron estratificar a los individuos según el tipo o la severidad de la mutación en *GBA1*, se observaron concentraciones significativamente más elevadas de GluCer en los pacientes EP-GBA, y en relación con la gravedad de la variante [151,172]. A pesar de ello, los intervalos de concentración tienden a solaparse entre grupos, lo que limita el poder discriminativo de estos marcadores. Diversos autores han remarcado que contar con una potencia estadística adecuada no implica necesariamente una relevancia clínica o biológica [170,174,272]. La correcta interpretación de estas diferencias requiere considerar tanto la precisión analítica del método empleado como la variabilidad biológica inherente del biomarcador [273,274]. Para que un analito resulte clínicamente útil, es deseable que presente una baja variabilidad intraindividual en relación con el cambio esperado. De este modo, más allá de la capacidad de discriminar entre distintos grupos, la estimación de su variación biológica permitiría obtener datos útiles para valorar su utilidad clínica a nivel individual. En el caso de GluCer, no existen bases de datos al respecto, y la mejor estimación disponible es la proporcionada por den Heijer et al. [166], que calculó una variabilidad intraindividual interdiaria del 5,8–12% de GluCer en plasma, dependiendo de la isoforma y el estado clínico del paciente, y que ofrece un punto de partida para futuras investigaciones orientadas a definir su aplicabilidad clínica.

En conjunto, estas evidencias apoyan el interés de los GSL y sus ratios como biomarcadores exploratorios en la EP, incluso en ausencia de mutaciones en *GBA1*, cuando existen alteraciones en rutas funcionalmente relacionadas.

8.7. LIMITACIONES DE LA TESIS

Este estudio presenta diversas limitaciones que deben ser tenidas en cuenta al interpretar los resultados.

8.7.1. Limitaciones relacionadas con la fase de optimización de los métodos.

En primer lugar, aunque los métodos empleados para cuantificar los modelos preclínicos han sido monitorizados para garantizar la coherencia de los resultados, aún no han sido validados conforme a las guías internacionales. Asimismo, sería recomendable reconsiderar posibles modificaciones en el pretratamiento de las muestras y en la preparación de las curvas de calibración.

Por otro lado, para mantener la coherencia con estudios previos de cuantificación en tejido y considerando las limitaciones de recursos, se decidió priorizar la optimización del método LC-MS/MS con cromatografía HILIC para la cuantificación de los isómeros en LCR humano, mientras que la cuantificación de las isoformas en tejido cerebral murino se realizó mediante cromatografía de fase reversa. Aunque este último enfoque evidenció diferencias entre grupos en varios de los estudios presentados en esta tesis, la incapacidad de separar los isómeros GalCer y GluCer podría haber atenuado dichas diferencias e incluso interferido o enmascarado su detección en otros estudios. Por ello, en el futuro sería recomendable completar la optimización y evaluación del método basado en cromatografía HILIC para posteriores cuantificaciones de los isómeros en tejido cerebral.

Por último, no fue posible incluir GluSph en el perfil para LCR debido a la limitada capacidad de detección del método. Durante el desarrollo de esta tesis se publicó el primer y único estudio que logró su cuantificación, incluyendo una validación del LoQ en términos de precisión y veracidad, mediante el acoplamiento en serie de dos columnas HILIC [175]. Este trabajo pone de manifiesto la dificultad asociada a su análisis y la necesidad de una mayor optimización instrumental y de recursos.

8.7.2. Limitaciones relacionadas con la evaluación del método para la cuantificación de isoformas en LCR.

Si bien se siguieron las recomendaciones generales de las principales guías internacionales, la aplicación práctica de ciertos protocolos y criterios se ajustó a las condiciones reales del laboratorio, marcadas por la disponibilidad limitada de instrumental, restricciones de tiempo y, especialmente, por la dificultad para obtener volúmenes suficientes de LCR, tanto en términos de cantidad total como de diversidad de lotes. Esta limitación condicionó el diseño experimental, reduciendo el número de niveles de concentración y de réplicas, y obligó a adaptar procedimientos que, en condiciones ideales, hubieran requerido un volumen mayor, como los destinados a la evaluación del efecto matriz o la equivalencia de curvas. Además, la presencia endógena de los analitos en la matriz, dificultó el uso de LCR nativo, al no disponerse de un procedimiento de depleción eficiente.

Una limitación adicional del estudio fue la falta de evaluación de interferentes endógenos, como la posible contaminación sanguínea del LCR en caso de punción lumbar traumática. Aunque las muestras utilizadas eran visualmente transparentes, no puede descartarse un efecto sobre las concentraciones de GluCer, especialmente considerando que en plasma sus niveles son diez veces superiores y que su proporción relativa respecto a GalCer también está invertida [175]. No existen estudios específicos para esfingolípidos, pero sí para la α -sinucleína. El punto de corte “empírico” que suele ser utilizado es de 200 ng/mL [275–277], pero Paciotti et al. [278] definieron un umbral máximo permisible de hemoglobina de 1,5 μ g/L, que no es detectable macroscópicamente. Estos factores podrían estar influyendo en los resultados de este y otros estudios, y debería considerarse en futuras investigaciones.

Por ello, sería recomendable contemplar el uso de matrices alternativas, la inclusión de un mayor número de concentraciones y la evaluación de distintas condiciones preanalíticas, como la presencia de hemólisis. Asimismo, sería deseable ampliar los estudios a otras isoformas disponibles comercialmente, como las GalCer, especialmente para estudios de selectividad y de efecto matriz.

Desde el punto de vista instrumental, se observaron disminuciones progresivas en las áreas absolutas durante la reinyección de series consecutivas de muestras. Estas reducciones, de entre un 15% y un 30% según el analito, afectaron a los valores calculados de ME, RE y PE, y podrían estar asociadas a inestabilidad del sistema o del interfaz, tal como se ha descrito previamente [213]. Además, el orden de inyección puede influir en la estimación del efecto matriz, introduciendo un posible sesgo adicional [239].

Cabe señalar que existen enfoques alternativos, complementarios al diseño experimental propuesto para la evaluación del efecto matriz, que proporcionan estrategias más amplias para identificar fuentes adicionales de la pérdida de analito, investigando el origen de ME y RE, y estimando por separado la contribución del IS y los estándares [236,243]. También se han descrito estrategias para estimar la eficiencia global del proceso, minimizando la variabilidad metodológica, mediante la diferencia de la variabilidad entre distintos lotes y el de un único lote analizado de forma repetida [234,235].

8.7.3. Limitaciones relacionadas con la aplicación clínica en la cohorte VHIP.

El tamaño reducido de la cohorte limitó la posibilidad de extraer conclusiones estadísticamente sólidas sobre las diferencias entre grupos. Además, durante el análisis de muestras, varias isoformas de GluCer fueron detectables cromatográficamente, pero se encontraron por debajo del LoQ en algunos individuos. Las tasas de recuperación observadas apuntaron a pérdidas relevantes durante la extracción, lo que compromete la eficiencia global del método, especialmente en concentraciones próximas a este límite.

8.8. PERSPECTIVAS FUTURAS

8.8.1. Medicina personalizada.

En 2024 se publicaron las primeras recomendaciones consensuadas [279] para mejorar la comunicación en el asesoramiento genético de EP en portadores de variantes en *GBA1*, considerando la penetrancia incompleta y la complejidad de estimar el riesgo individual. La estratificación de portadores de variantes en *GBA1*, tanto en la fase prodrómica como en la fase manifiesta de la enfermedad, por tanto, se ha convertido en una necesidad para abordar cuestiones relacionadas con la progresión y el pronóstico de la enfermedad, y la respuesta a potenciales tratamientos específicos [128,129]. En el contexto actual, en el que se están iniciando los primeros ensayos clínicos en pacientes con EP-GBA, como los desarrollados por Bial (chaperona farmacológica) y *Prevail Therapeutics* (terapia génica) (Tabla 4), resulta fundamental disponer de biomarcadores que permitan validar la eficacia terapéutica y/o servir como criterio de inclusión de subgrupos específicos.

Aunque la evidencia disponible aún no permite establecer conclusiones definitivas sobre el valor individual de biomarcadores como la actividad enzimática o la concentración de GSL, su combinación entre ellos y con otras pruebas complementarias ha mostrado mejorar la precisión diagnóstica [10,148,280]. En esta línea, se han propuesto combinaciones como especies de α -sinucleína con actividad de β -GCasa [148], o proteínas asociadas al daño neuroaxonal, como Tau o NfL, cada vez más implementadas en la rutina asistencial de los laboratorios clínicos, para mejorar la estratificación de los pacientes [129]. Asimismo, otros lípidos han sido propuestos como biomarcadores, incluyendo gangliósidos complejos [143,176] y colesterol glucosilado [26], por lo que ampliar el perfil bioquímico analizado representa una posible vía de desarrollo complementaria. Además, la evidencia disponible sugiere que estas estrategias podrían extenderse a subgrupos más amplios de pacientes con EP sin variantes en *GBA1*, lo que refuerza su potencial utilidad más allá del contexto genético concreto y respalda su valor en un enfoque más personalizado de la enfermedad.

La dirección actual en el estudio de la EP avanza hacia sistemas de estadificación biológica, que complementan los criterios clínicos mediante la integración de biomarcadores objetivos (neuroimagen, bioquímicos y/o genéticos) [127,281]. Este enfoque, ya consolidado en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer mediante la clasificación biológica AT(N) de la National Institute on Aging – Alzheimer’s Association (NIA-AA) de 2018 [282], plantea una redefinición de estas entidades clínicas en función de perfiles de biomarcadores. En el caso de la EP, se incluyen dominios como biomarcadores de α -sinucleína, disfunción lisosomal, alteraciones lipídicas y variantes genéticas, que resultan especialmente relevantes en subentidades como EP-GBA (Figura 45).

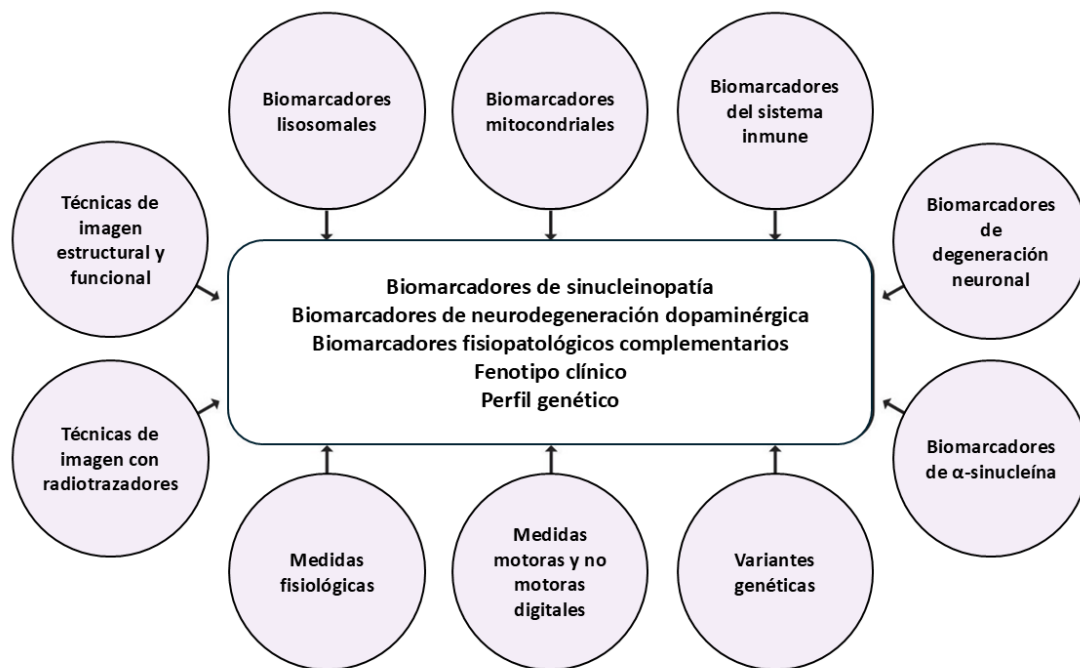


Figura 45. Categorías prometedoras de biomarcadores para el sistema de estadificación biológica en EP. El recuadro central representa los posibles ejes: biomarcadores de α -sinucleína (técnicas bioquímicas como inmunoensayos o RT-QuIC); biomarcadores de neurodegeneración dopaminérgica (técnicas de imagen funcional y estructural como DaT-SPECT, FDOPA-PET o MRI); biomarcadores de fisiopatología complementaria (como alteraciones lisosomales, mitocondriales, inflamatorias o de estrés oxidativo); fenotipo clínico (medidas clínicas motoras y no motoras); y perfil genético (variantes patogénicas en *SNCA*, *PRKN*, *PINK1*, *LRRK2* o *GBA1*). Adaptada de Chahine et al. [281].

8.8.2. Estandarización y armonización de metodologías EP-GBA.

El uso de protocolos, solventes y estándares comunes a lo largo de todo el proceso de optimización secuencial tiene como finalidad promover la armonización entre modelos y matrices. Esta continuidad metodológica desde etapas preclínicas presentaría ventajas en términos de comparabilidad entre resultados experimentales, permite una mejor interpretación de los hallazgos y facilita la transferencia de conocimientos desde la investigación básica al contexto clínico.

En este contexto, el LCR y la sangre se consideran las principales matrices de interés, al permitir una evaluación *in vivo* de los procesos fisiopatológicos de la enfermedad [283]. El LCR, por su proximidad al SNC, constituye una matriz ideal para la identificación de biomarcadores de patología cerebral, aunque su uso en el seguimiento longitudinal presenta limitaciones prácticas por la necesidad de realizar punciones lumbares repetidas. Las muestras de sangre emergen como una alternativa más accesible [129]. GluCer es abundante en sangre periférica y su concentración puede estar modulada por procesos sistémicos, por lo que podría no reflejar la patología cerebral; sin embargo, diferentes estudios han descrito incrementos en los niveles de esfingolípidos en pacientes EP respecto a individuos sanos [164–168].

Como parte del presente trabajo, se ha iniciado una aproximación preliminar del método con cromatografía HILIC a la matriz suero (Figura 46). Futuros trabajos podrían profundizar en su desarrollo para la caracterización de estos perfiles en sangre periférica, explorando su potencial como herramientas complementarias al LCR.

La estrategia metodológica descrita constituye una base sólida para su adaptación a nuevas aplicaciones, facilitando la armonización de protocolos en el estudio de EP-GBA. Al seguir una sistemática común, los métodos desarrollados presentan potencial para

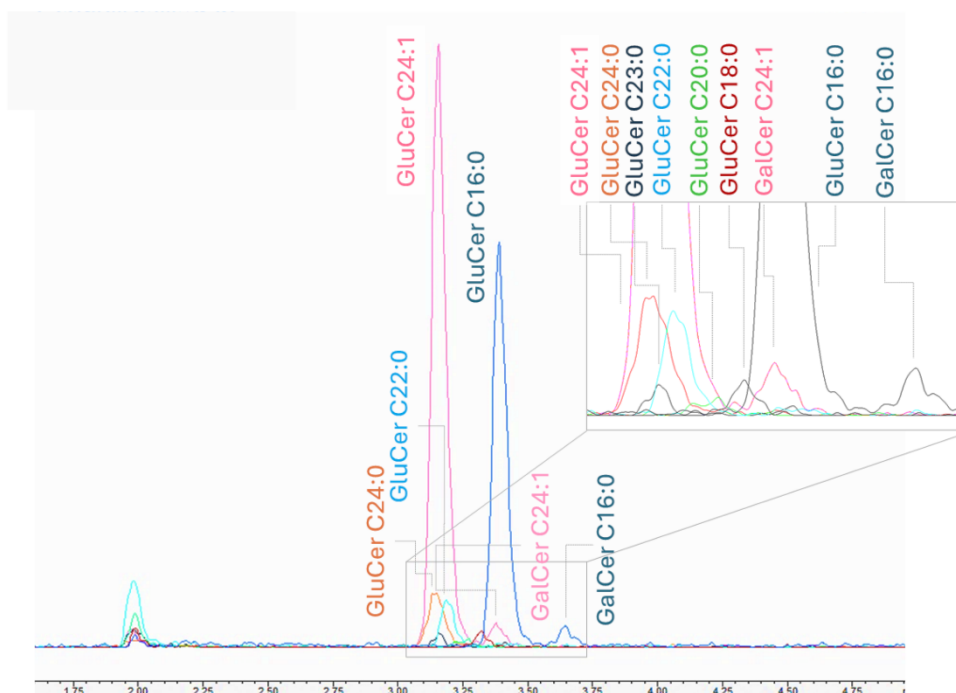


Figura 46. Cromatograma representativo de las isoformas en una muestra de suero humano analizada mediante HILIC-MS/MS. Se muestra la separación de los isómeros de GluCer y GalCer correspondientes a cada isoforma, los cuales eluyen en orden inverso a la longitud de cadena.

ser escalables e implementados en distintos laboratorios, promoviendo la creación de redes de validación externa y la colaboración en estudios multicéntricos. Además, las herramientas prácticas propuestas y la estandarización de los protocolos analíticos ofrecen una base útil para facilitar su implementación de forma sistemática, tanto en el contexto de la EP-GBA como en otros ámbitos del laboratorio clínico.

9

Conclusiones

1. Los métodos LC-MS/MS desarrollados para estudios en modelos preclínicos, pese a sus limitaciones metodológicas, mostraron una robustez adecuada y permitieron caracterizar alteraciones en HexCer y HexSph en modelos celulares y murinos con deficiencia de *GBA1*. En estudios traslacionales, se observó que la reducción de sustratos lipídicos constituyó un indicador más representativo de la eficacia terapéutica que el aumento de la actividad enzimática, ofreciendo un enfoque objetivo para la monitorización de nuevas estrategias terapéuticas.

2. Se desarrolló y validó un método LC-MS/MS basado en HILIC para la cuantificación de isoformas de GluCer y GalCer en LCR humano, cumpliendo los criterios de selectividad, límite de cuantificación, linealidad, precisión, veracidad, estabilidad y efecto matriz establecidos en las principales guías internacionales de validación de métodos bioanalíticos.

3. Ante la ausencia de recomendaciones armonizadas para el estudio del efecto matriz, la combinación de diferentes estrategias permitió una evaluación más integral. Se propuso un flujo de trabajo sistemático, acompañado de una herramienta de uso libre que automatiza cálculos e interpretación de resultados, facilitando la adherencia a las principales guías internacionales y promoviendo la estandarización de la evaluación.

4. En la cohorte VHIP, las ratios GluCer/GalCer fueron más altas en pacientes con EP que en los controles, especialmente en portadores de mutaciones en *GBA1* y en aquellos con variantes más severas, respaldando el valor potencial de los perfiles lipídicos en LCR como biomarcadores de EP-GBA.

5. La cuantificación de esfingolípidos mediante métodos LC-MS/MS *in-house* robustos proporciona información relevante tanto en modelos experimentales como en LCR humano, respaldando su aplicabilidad en investigación preclínica y clínica sobre la EP.

10

Referencias

1. Ou Z, Pan J, Tang S, Duan D, Yu D, Nong H, et al. Global Trends in the Incidence, Prevalence, and Years Lived With Disability of Parkinson's Disease in 204 Countries/Territories From 1990 to 2019. *Front Public Health*. 2021 Dec 7;9.
2. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 2017 Aug 1;124(8):901–5.
3. Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease. *The Lancet*. 2021 Jun 12;397(10291):2284–303.
4. Tolosa E, Garrido A, Scholz SW, Poewe W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2021 May;20(5):385–97.
5. Stoker TB, Greenland JC. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects. Codon Publications; 2018.
6. Calabresi P, Mechelli A, Natale G, Volpicelli-Daley L, Di Lazzaro G, Ghiglieri V. Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell Death Dis*. 2023 Mar 1;14(3):176.
7. Navarro-Romero A, Montpeyó M, Martínez-Vicente M. The Emerging Role of the Lysosome in Parkinson's Disease. *Cells*. 2020 Nov 2;9(11).
8. Mahul-Mellier AL, Bartscher J, Maharjan N, Weerens L, Croisier M, Kuttler F, et al. The process of Lewy body formation, rather than simply α -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020 Mar 3;117(9):4971–82.
9. Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2015 Oct;30(12):1591–601.
10. Esfandiary A, Finkelstein DI, Voelcker NH, Rudd D. Clinical Sphingolipids Pathway in Parkinson's Disease: From GCase to Integrated-Biomarker Discovery. *Cells*. 2022 Apr 15;11(8):1353.
11. Salles P, Tirapegui JM, Chaná-Cuevas P. Genetics of Parkinson's disease: Dominant forms and GBA. *Neurology Perspectives*. 2024 Jul;4(3):100153.
12. Finkbeiner S. The Autophagy Lysosomal Pathway and Neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2020 Mar;12(3):a033993.
13. Cerri S, Blandini F. Role of Autophagy in Parkinson's Disease. *Curr Med Chem*. 2019 Sep 13;26(20):3702–18.
14. Paciotti S, Albi E, Parnetti L, Beccari T. Lysosomal Ceramide Metabolism Disorders: Implications in Parkinson's Disease. *J Clin Med*. 2020 Feb 21;9(2):594.
15. Blumenreich S, Barav OB, Jenkins BJ, Futerman AH. Lysosomal Storage Disorders Shed Light on Lysosomal Dysfunction in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 14;21(14):4966.
16. Dehay B, Martínez-Vicente M, Caldwell GA, Caldwell KA, Yue Z, Cookson MR, et al. Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2013 Jun 11;28(6):725–32.
17. Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2020 Feb;19(2):170–8.

18. Morris H, Lim SY. Monogenic Parkinson Disease Overview. 2004 May 25 [Updated 2025 May 15]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews®. University of Washington, Seattle; 1993-2025.
19. Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Adesina A, Ahmad S, et al. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res.* 2025 Jan 6;53(D1):D609–17.
20. Martinez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM. Protein degradation and aging. *Exp Gerontol.* 2005 Aug;40(8–9):622–33.
21. Martinez-Vicente M. Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Apr;40:115–26.
22. Valdor R, Martinez-Vicente M. The Role of Chaperone-Mediated Autophagy in Tissue Homeostasis and Disease Pathogenesis. *Biomedicines.* 2024 Jan 23;12(2):257.
23. Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild Type α -Synuclein Is Degraded by Chaperone-mediated Autophagy and Macroautophagy in Neuronal Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2008 Aug;283(35):23542–56.
24. Maria Cuervo A. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 2004 Feb;14(2):70–7.
25. Kuo SH, Tasset I, Cheng MM, Diaz A, Pan MK, Lieberman OJ, et al. Mutant glucocerebrosidase impairs α -synuclein degradation by blockade of chaperone-mediated autophagy. *Sci Adv.* 2022 Feb 11;8(6).
26. Pradas E, Martinez-Vicente M. The Consequences of GBA Deficiency in the Autophagy–Lysosome System in Parkinson’s Disease Associated with GBA. *Cells.* 2023 Jan 3;12(1):191.
27. Sosero YL, Gan-Or Z. LRRK2 and Parkinson’s disease: from genetics to targeted therapy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2023 Jun 6;10(6):850–64.
28. Kuo SH, Orenstein S, Koga H, Tang G, Kanter E, Alcalay R, et al. LRRK2 G2019S Impairs Chaperone-Mediated Autophagy in Neurons (IN2-1.001). *Neurology.* 2013;80(7_supplement):IN2-1.001-IN2-1.001.
29. O’Callaghan B, Hardy J, Plun-Favreau H. PINK1: From Parkinson’s disease to mitophagy and back again. *PLoS Biol.* 2023 Jun 29;21(6):e3002196.
30. Kabuta T, Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K. Aberrant Interaction between Parkinson Disease-associated Mutant UCH-L1 and the Lysosomal Receptor for Chaperone-mediated Autophagy. *Journal of Biological Chemistry.* 2008 Aug;283(35):23731–8.
31. Park J, Blair NF, Sue CM. The role of ATP13A2 in Parkinson’s disease: Clinical phenotypes and molecular mechanisms. *Movement Disorders.* 2015 May 21;30(6):770–9.
32. Dehay B, Martinez-Vicente M, Ramirez A, Perier C, Klein C, Vila M, et al. Lysosomal dysfunction in Parkinson disease: ATP13A2 gets into the groove. *Autophagy.* 2012 Sep 14;8(9):1389–91.
33. Platt FM, d’Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tiffet CJ. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2018 Oct 1;4(1):27.
34. Klein AD, Mazzulli JR. Is Parkinson’s disease a lysosomal disorder? *Brain.* 2018 Aug 1;141(8):2255–62.

35. Alessenko A V., Albi E. Exploring Sphingolipid Implications in Neurodegeneration. *Front Neurol.* 2020 May 21;11.
36. Robak LA, Jansen IE, van Rooij J, Uitterlinden AG, Kraaij R, Jankovic J, et al. Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson's disease. *Brain.* 2017 Dec 1;140(12):3191–203.
37. Erskine D, Koss D, Korolchuk VI, Outeiro TF, Attems J, McKeith I. Lipids, lysosomes and mitochondria: insights into Lewy body formation from rare monogenic disorders. *Acta Neuropathol.* 2021 Apr 30;141(4):511–26.
38. Parenti G, Medina DL, Ballabio A. The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. *EMBO Mol Med.* 2021 Feb 5;13(2).
39. Grabowski GA. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *The Lancet.* 2008 Oct;372(9645):1263–71.
40. Companioni O, Mir C, Garcia-Mayea Y, Lleonart ME. Targeting Sphingolipids for Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2021 Oct 19;11.
41. Merrill AH. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem Rev.* 2011 Oct 12;111(10):6387–422.
42. Reza S, Ugorski M, Suchański J. Glucosylceramide and galactosylceramide, small glycosphingolipids with significant impact on health and disease. *Glycobiology.* 2021 Nov 1;31(11):1416–34.
43. Canela N, Herrero P, Mariné S, Nadal P, Ras MR, Rodríguez MÁ, et al. Analytical methods in sphingolipidomics: Quantitative and profiling approaches in food analysis. *J Chromatogr A.* 2016 Jan;1428:16–38.
44. Sandhoff R, Sandhoff K. Neuronal Ganglioside and Glycosphingolipid (GSL) Metabolism and Disease. In 2023. p. 333–90.
45. Sandhoff K, Kolter T. Topology of glycosphingolipid degradation. *Trends Cell Biol.* 1996 Mar;6(3):98–103.
46. D'Angelo G, Capasso S, Sticco L, Russo D. Glycosphingolipids: synthesis and functions. *FEBS Journal.* 2013 Dec;280(24):6338–53.
47. O'Regan G, deSouza RM, Balestrino R, Schapira AH. Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. *J Parkinsons Dis.* 2017 Aug 8;7(3):411–22.
48. Smith L, Schapira AHV. GBA Variants and Parkinson Disease: Mechanisms and Treatments. *Cells.* 2022 Apr 1;11(8).
49. Aerts JMFG, Kuo CL, Lelieveld LT, Boer DEC, van der Lienden MJC, Overkleeft HS, et al. Glycosphingolipids and lysosomal storage disorders as illustrated by gaucher disease. *Curr Opin Chem Biol.* 2019 Dec;53:204–15.
50. Körschen HG, Yildiz Y, Raju DN, Schonauer S, Bönigk W, Jansen V, et al. The Non-lysosomal β -Glucosidase GBA2 Is a Non-integral Membrane-associated Protein at the Endoplasmic Reticulum (ER) and Golgi. *Journal of Biological Chemistry.* 2013 Feb;288(5):3381–93.
51. Revel-Vilk S, Fuller M, Zimran A. Value of Glucosylsphingosine (Lyso-Gb1) as a Biomarker in Gaucher Disease: A Systematic Literature Review. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 28;21(19):7159.

52. Hughes DA, Pastores GM. Gaucher Disease. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, eds. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; July 27, 2000.
53. Vieira SRL, Schapira AH V. Glucocerebrosidase mutations and Parkinson disease. *J Neural Transm.* 2022 Sep 6;129(9):1105–17.
54. Parlar SC, Grenn FP, Kim JJ, Baluwendraat C, Gan-Or Z. Classification of GBA1 Variants in Parkinson's Disease: The GBA1-PD Browser. *Mov Disord.* 2023 Mar 1;38(3):489–95.
55. Huh YE, Chiang MSR, Locascio JJ, Liao Z, Liu G, Choudhury K, et al. β -Glucocerebrosidase activity in GBA-linked Parkinson disease: The type of mutation matters. *Neurology.* 2020 Aug 11;95(6):E685–96.
56. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *Journal of Clinical Investigation.* 1994 Mar 1;93(3):1288–92.
57. Dekker N, van Dussen L, Hollak CEM, Overkleeft H, Scheij S, Ghauharali K, et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood.* 2011 Oct 20;118(16):e118–27.
58. Roy M, Boyer L, Barbeau A. A Prospective Study of 50 Cases of Familial Parkinson's Disease. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques.* 1983 Feb 18;10(1):37–42.
59. McKeran RO, Bradbury P, Taylor D, Stern G. Neurological involvement in type 1 (adult) Gaucher's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1985 Feb 1;48(2):172–5.
60. Sidransky E, Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2012 Nov;11(11):986–98.
61. Bultron G, Kacena K, Pearson D, Boxer M, Yang R, Sathe S, et al. The risk of Parkinson's disease in type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis.* 2010 Apr;33(2):167–73.
62. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2009 Oct 22;361(17):1651–61.
63. Riboldi GM, Di Fonzo AB. GBA, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: From Genetic to Clinic to New Therapeutic Approaches. *Cells.* 2019 Apr 1;8(4).
64. Gan-Or Z, Amshalom I, Kilarski LL, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Mirelman A, et al. Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. *Neurology.* 2015 Mar 3;84(9):880–7.
65. Koros C, Bougea A, Alefanti I, Simitsi AM, Papagiannakis N, Pachi I, et al. A Global Perspective of GBA1-Related Parkinson's Disease: A Narrative Review. *Genes (Basel).* 2024 Dec 16;15(12):1605.
66. Jesús S, Huertas I, Bernal-Bernal I, Bonilla-Toribio M, Cáceres-Redondo MT, Vargas-González L, et al. GBA Variants Influence Motor and Non-Motor Features of Parkinson's Disease. *PLoS One.* 2016 Dec 28;11(12):e0167749.

67. Cilia R, Tunesi S, Marotta G, Cereda E, Siri C, Tesei S, et al. Survival and dementia in GBA-associated Parkinson's disease: The mutation matters. *Ann Neurol*. 2016 Nov 1;80(5):662–73.
68. Liu G, Boot B, Locascio JJ, Jansen IE, Winder-Rhodes S, Eberly S, et al. Specifically neuropathic Gaucher's mutations accelerate cognitive decline in Parkinson's. *Ann Neurol*. 2016 Nov 18;80(5):674–85.
69. Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H, Tang MX, Rosado L, Orbe Reilly M, et al. Cognitive performance of GBA mutation carriers with early-onset PD The CORE-PD study. *Neurology*. 2012 May;78(18):1434–40.
70. Brockmann K, Srulijes K, Hauser AK, Schulte C, Csoti I, Gasser T, et al. GBA-associated PD presents with nonmotor characteristics. *Neurology*. 2011 Jul 19;77(3):276–80.
71. Oeda T, Umemura A, Mori Y, Tomita S, Kohsaka M, Park K, et al. Impact of glucocerebrosidase mutations on motor and nonmotor complications in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2015 Dec;36(12):3306–13.
72. Clark LN, Ross BM, Wang Y, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology*. 2007 Sep;69(12):1270–7.
73. Gómez-Garre P, Martín-Bórnez M, Muñoz-Delgado L, Díaz-Belloso R, Periñán MT, Bonilla-Toribio M, et al. Understanding Parkinson disease in Spain: Genetic and clinical insights. *Eur J Neurol*. 2025 Jan 5;32(1).
74. Skrahin A, Horowitz M, Istiti M, Skrahina V, Lukas J, Yahalom G, et al. GBA1-Associated Parkinson's Disease Is a Distinct Entity. *Int J Mol Sci*. 2024 Jun 28;25(13):7102.
75. Istiti M, Yahalom G, Cohen M, Skrahina V, Skrahin A, Lukas J, et al. Sidransky Syndrome—GBA1-Related Parkinson's Disease and Its Targeted Therapies. *Int J Mol Sci*. 2025 Apr 6;26(7):3435.
76. Huh YE, Usnich T, Scherzer CR, Klein C, Chung SJ. GBA1 Variants and Parkinson's Disease: Paving the Way for Targeted Therapy. *J Mov Disord*. 2023 Sep 30;16(3):261–78.
77. Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*. 2011 Jul 8;146(1):37–52.
78. Navarro-Romero A, Fernandez-Gonzalez I, Riera J, Montpeyo M, Albert-Bayo M, Lopez-Royo T, et al. Lysosomal lipid alterations caused by glucocerebrosidase deficiency promote lysosomal dysfunction, chaperone-mediated-autophagy deficiency, and alpha-synuclein pathology. *NPJ Parkinsons Dis*. 2022 Dec 1;8(1).
79. Hamler R, Brignol N, Clark SW, Morrison S, Dungan LB, Chang HH, et al. Glucosylceramide and Glucosylsphingosine Quantitation by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to Enable In Vivo Preclinical Studies of Neuronopathic Gaucher Disease. *Anal Chem*. 2017 Aug 15;89(16):8288–95.
80. Sun Y, Zhang W, Xu YH, Quinn B, Dasgupta N, Liou B, et al. Substrate compositional variation with tissue/region and Gba1 mutations in mouse models--implications for Gaucher disease. *PLoS One*. 2013 Mar 8;8(3).

81. Polinskii NK, Martinez TN, Gorodinsky A, Gareus R, Sasner M, Herberth M, et al. Decreased glucocerebrosidase activity and substrate accumulation of glycosphingolipids in a novel GBA1 D409V knock-in mouse model. *PLoS One*. 2021 Jun 1;16(6).
82. Sardi SP, Clarke J, Kinnecom C, Tamsett TJ, Li L, Stanek LM, et al. CNS expression of glucocerebrosidase corrects α -synuclein pathology and memory in a mouse model of Gaucher-related synucleinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011 Jul 19;108(29):12101–6.
83. Farfel-Becker T, Do J, Tayebi N, Sidransky E. Can GBA1-Associated Parkinson Disease Be Modeled in the Mouse? *Trends Neurosci*. 2019 Sep;42(9):631–43.
84. Kim D, Hwang H, Choi S, Kwon SH, Lee S, Park JH, et al. D409H GBA1 mutation accelerates the progression of pathology in A53T α -synuclein transgenic mouse model. *Acta Neuropathol Commun*. 2018 Dec 27;6(1):32.
85. Rockenstein E, Clarke J, Viel C, Panarello N, Treleaven CM, Kim C, et al. Glucocerebrosidase modulates cognitive and motor activities in murine models of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2016 Apr 28;ddw124.
86. Polinski NK, Martinez TN, Ramboz S, Sasner M, Herberth M, Switzer R, et al. The GBA1 D409V mutation exacerbates synuclein pathology to differing extents in two alpha-synuclein models. *Dis Model Mech*. 2022 Jun 1;15(6).
87. Yun SP, Kim D, Kim S, Kim S, Karuppagounder SS, Kwon SH, et al. α -Synuclein accumulation and GBA deficiency due to L444P GBA mutation contributes to MPTP-induced parkinsonism. *Mol Neurodegener*. 2018 Dec 8;13(1):1.
88. Schöndorf DC, Aureli M, McAllister FE, Hindley CJ, Mayer F, Schmid B, et al. iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nat Commun*. 2014 Jun 6;5(1):4028.
89. Ginns EI, Mak SKK, Ko N, Karlgren J, Akbarian S, Chou VP, et al. Neuroinflammation and α -synuclein accumulation in response to glucocerebrosidase deficiency are accompanied by synaptic dysfunction. *Mol Genet Metab*. 2014 Feb;111(2):152–62.
90. Rocha EM, Smith GA, Park E, Cao H, Graham AR, Brown E, et al. Sustained Systemic Glucocerebrosidase Inhibition Induces Brain α -Synuclein Aggregation, Microglia and Complement C1q Activation in Mice. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Aug 20;23(6):550–64.
91. Leyns CEG, Prigent A, Beezhold B, Yao L, Hatcher NG, Tao P, et al. Glucocerebrosidase activity and lipid levels are related to protein pathologies in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis*. 2023 May 11;9(1):74.
92. Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E, et al. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased α -synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain*. 2014 Mar;137(3):834–48.
93. Rocha EM, Smith GA, Park E, Cao H, Brown E, Hallett P, et al. Progressive decline of glucocerebrosidase in aging and Parkinson's disease. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 Apr 1;2(4):433–8.
94. Gegg ME, Menozzi E, Schapira AHV. Glucocerebrosidase-associated Parkinson disease: Pathogenic mechanisms and potential drug treatments. *Neurobiol Dis*. 2022 May;166:105663.

95. Zhang X, Wu H, Tang B, Guo J. Clinical, mechanistic, biomarker, and therapeutic advances in GBA1-associated Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2024 Sep 12;13(1):48.
96. Avenali M, Blandini F, Cerri S. Glucocerebrosidase Defects as a Major Risk Factor for Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2020 Apr 21;12.
97. Stojkovska I, Krainc D, Mazzulli JR. Molecular mechanisms of α -synuclein and GBA1 in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* 2018 Jul 24;373(1):51–60.
98. Fernandes HJR, Hartfield EM, Christian HC, Emmanouilidou E, Zheng Y, Booth H, et al. ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular α -Synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-Derived Dopamine Neurons. *Stem Cell Reports.* 2016 Mar;6(3):342–56.
99. Sillence DJ. Glucosylceramide modulates endolysosomal pH in Gaucher disease. *Mol Genet Metab.* 2013 Jun;109(2):194–200.
100. Bae EJ, Yang NY, Lee C, Lee HJ, Kim S, Sardi SP, et al. Loss of glucocerebrosidase 1 activity causes lysosomal dysfunction and α -synuclein aggregation. *Exp Mol Med.* 2015 Mar 27;47(3):e153–e153.
101. Kaushik S, Massey AC, Cuervo AM. Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy. *EMBO J.* 2006 Sep 6;25(17):3921–33.
102. Perissinotto F, Rondelli V, Parisse P, Tormena N, Zunino A, Almásy L, et al. GM1 Ganglioside role in the interaction of Alpha-synuclein with lipid membranes: Morphology and structure. *Biophys Chem.* 2019 Dec;255:106272.
103. Galvagnion C, Brown JWP, Oubrai MM, Flagmeier P, Vendruscolo M, Buell AK, et al. Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2016 Jun 28;113(26):7065–70.
104. Taguchi Y V., Liu J, Ruan J, Pacheco J, Zhang X, Abbasi J, et al. Glucosylsphingosine Promotes α -Synuclein Pathology in Mutant GBA-Associated Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience.* 2017 Oct 4;37(40):9617–31.
105. Zunke F, Moise AC, Belur NR, Gelyana E, Stojkovska I, Dzaferbegovic H, et al. Reversible Conformational Conversion of α -Synuclein into Toxic Assemblies by Glucosylceramide. *Neuron.* 2018 Jan;97(1):92-107.e10.
106. Suzuki M, Sango K, Wada K, Nagai Y. Pathological role of lipid interaction with α -synuclein in Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2018 Oct;119:97–106.
107. Paul A, Jacoby G, Laor Bar-Yosef D, Beck R, Gazit E, Segal D. Glucosylceramide Associated with Gaucher Disease Forms Amyloid-like Twisted Ribbon Fibrils That Induce α -Synuclein Aggregation. *ACS Nano.* 2021 Jul 27;15(7):11854–68.
108. Kim S, Wong YC, Gao F, Krainc D. Dysregulation of mitochondria-lysosome contacts by GBA1 dysfunction in dopaminergic neuronal models of Parkinson's disease. *Nat Commun.* 2021 Mar 22;12(1):1807.
109. Cleeter MWJ, Chau KY, Gluck C, Mehta A, Hughes DA, Duchen M, et al. Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. *Neurochem Int.* 2013 Jan;62(1):1–7.
110. Klein AD, Outeiro TF. Glucocerebrosidase mutations disrupt the lysosome and now the mitochondria. *Nat Commun.* 2023 Oct 11;14(1):6383.

111. Bo RX, Li YY, Zhou TT, Chen NH, Yuan YH. The neuroinflammatory role of glucocerebrosidase in Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 2022 Apr;207:108964.
112. Ron I, Horowitz M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Hum Mol Genet*. 2005 Aug 15;14(16):2387–98.
113. Kilpatrick BS, Magalhaes J, Beavan MS, McNeill A, Gegg ME, Cleeter MWJ, et al. Endoplasmic reticulum and lysosomal Ca²⁺ stores are remodelled in GBA1-linked Parkinson disease patient fibroblasts. *Cell Calcium*. 2016 Jan;59(1):12–20.
114. McFarthing K, Buff S, Rafaloff G, Pitzer K, Fiske B, Navangul A, et al. Parkinson's Disease Drug Therapies in the Clinical Trial Pipeline: 2024 Update. *J Parkinsons Dis*. 2024 Jul 23;14(5):899–912.
115. Koros C, Fiske B, Stefanis L. Gaps in the Parkinson's disease therapeutic clinical pipeline: A focus on approaches targeting disease pathobiology. *J Parkinsons Dis*. 2025 Jun 30;
116. Uspenskaya O, Mahoney E, Verselis L, Lowrey M, Velaga J, Sevigny J. Design of Phase 1/2a Study of AAV9-Based Gene Therapy for Parkinson's Disease with Pathogenic GBA1 Mutations (PROPEL Trial) (1624). *Neurology*. 2020 Apr 14;94(15_supplement).
117. Mullin S, Smith L, Lee K, D'Souza G, Woodgate P, Elflein J, et al. Ambroxol for the Treatment of Patients With Parkinson Disease With and Without Glucocerebrosidase Gene Mutations. *JAMA Neurol*. 2020 Apr 1;77(4):427.
118. Kopytova AE, Rychkov GN, Nikolaev MA, Baydakova GV, Cheblov AA, Senkevich KA, et al. Ambroxol increases glucocerebrosidase (GCase) activity and restores GCase translocation in primary patient-derived macrophages in Gaucher disease and Parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord*. 2021 Mar;84:112–21.
119. Yang SY, Taanman JW, Gegg M, Schapira AH V. Ambroxol reverses tau and α -synuclein accumulation in a cholinergic N370S GBA1 mutation model. *Hum Mol Genet*. 2022 Jul 21;31(14):2396–405.
120. Colucci F, Avenali M, De Micco R, Fusar Poli M, Cerri S, Stanziano M, et al. Ambroxol as a disease-modifying treatment to reduce the risk of cognitive impairment in GBA -associated Parkinson's disease: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase II trial. The AMBITIOUS study protocol. *BMJ Neurol Open*. 2023 Nov;5(2):e000535.
121. Montpeyo M, Pérez-Carmona N, Cubero E, Delgado A, Ruano A, Carrillo J, et al. Developing Allosteric Chaperones for GBA1-Associated Disorders—An Integrated Computational and Experimental Approach. *Int J Mol Sci*. 2024 Dec 24;26(1):9.
122. Aflaki E, Borger DK, Moaven N, Stubblefield BK, Rogers SA, Patnaik S, et al. A New Glucocerebrosidase Chaperone Reduces α -Synuclein and Glycolipid Levels in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons from Patients with Gaucher Disease and Parkinsonism. *Journal of Neuroscience*. 2016 Jul 13;36(28):7441–52.
123. Richter F, Fleming SM, Watson M, Lemesre V, Pellegrino L, Raney B, et al. A GCase chaperone improves motor function in a mouse model of synucleinopathy. *Neurotherapeutics*. 2014 Oct;11(4):840–56.
124. den Heijer JM, Kruithof AC, Moerland M, Walker M, Dudgeon L, Justman C, et al. A Phase 1B Trial in GBA1-Associated Parkinson's Disease of BIA-28-6156, a Glucocerebrosidase Activator. *Movement Disorders*. 2023 Jul 17;38(7):1197–208.

125. Peterschmitt MJ, Saiki H, Hatano T, Gasser T, Isaacson SH, Gaemers SJM, et al. Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Oral Venglustat in Patients with Parkinson's Disease and a GBA Mutation: Results from Part 1 of the Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled MOVES-PD Trial. *J Parkinsons Dis.* 2022 Feb 15;12(2):557–70.
126. Giladi N, Alcalay RN, Cutter G, Gasser T, Gurevich T, Höglinger GU, et al. Safety and efficacy of venglustat in GBA1-associated Parkinson's disease: an international, multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 2023 Aug;22(8):661–71.
127. Höglinger GU, Adler CH, Berg D, Klein C, Outeiro TF, Poewe W, et al. A biological classification of Parkinson's disease: the SynNeurGe research diagnostic criteria. *Lancet Neurol.* 2024 Feb;23(2):191–204.
128. Menozzi E, Schapira AH V. Exploring the Genotype–Phenotype Correlation in GBA-Parkinson Disease: Clinical Aspects, Biomarkers, and Potential Modifiers. *Front Neurol.* 2021 Jun 24;12.
129. Parnetti L, Gaetani L, Eusebi P, Paciotti S, Hansson O, El-Agnaf O, et al. CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2019 Jun;18(6):573–86.
130. Morris HR, Spillantini MG, Sue CM, Williams-Gray CH. The pathogenesis of Parkinson's disease. *The Lancet.* 2024 Jan;403(10423):293–304.
131. Paciotti S, Gatticchi L, Beccari T, Parnetti L. Lysosomal enzyme activities as possible CSF biomarkers of synucleinopathies. *Clinica Chimica Acta.* 2019 Aug;495:13–24.
132. Paolini Paoletti F, Gaetani L, Parnetti L. The Challenge of Disease-Modifying Therapies in Parkinson's Disease: Role of CSF Biomarkers. *Biomolecules.* 2020 Feb 19;10(2):335.
133. Xie F, Gao X, Yang W, Chang Z, Yang X, Wei X, et al. Advances in the Research of Risk Factors and Prodromal Biomarkers of Parkinson's Disease. *ACS Chem Neurosci.* 2019 Feb 20;10(2):973–90.
134. Zhao Y, Yang G. Potential of extracellular vesicles in the Parkinson's disease – Pathological mediators and biomarkers. *Neurochem Int.* 2021 Mar;144:104974.
135. Xicoy H, Peñuelas N, Vila M, Laguna A. Autophagic- and Lysosomal-Related Biomarkers for Parkinson's Disease: Lights and Shadows. *Cells.* 2019 Oct 25;8(11):1317.
136. Emamzadeh FN, Surguchov A. Parkinson's Disease: Biomarkers, Treatment, and Risk Factors. *Front Neurosci.* 2018 Aug 30;12.
137. Doxakis E. Cell-free microRNAs in Parkinson's disease: potential biomarkers that provide new insights into disease pathogenesis. *Ageing Res Rev.* 2020 Mar;58:101023.
138. Gopar-Cuevas Y, Duarte-Jurado AP, Diaz-Perez RN, Saucedo-Cardenas O, Loera-Arias MJ, Montes-de-Oca-Luna R, et al. Pursuing Multiple Biomarkers for Early Idiopathic Parkinson's Disease Diagnosis. *Mol Neurobiol.* 2021 Nov 5;58(11):5517–32.
139. Gegg ME, Sweet L, Wang BH, Shihabuddin LS, Sardi SP, Schapira AHV. No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations. *Mov Disord.* 2015 Jul 1;30(8):1085–9.
140. Gegg ME, Burke D, Heales SJR, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, et al. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann Neurol.* 2012 Sep 2;72(3):455–63.

141. Moors TE, Paciotti S, Ingrassia A, Quadri M, Breedveld G, Tasegian A, et al. Characterization of Brain Lysosomal Activities in GBA-Related and Sporadic Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *Mol Neurobiol*. 2019 Feb 8;56(2):1344–55.
142. Gündner AL, Duran-Pacheco G, Zimmermann S, Ruf I, Moors T, Baumann K, et al. Path mediation analysis reveals GBA impacts Lewy body disease status by increasing α -synuclein levels. *Neurobiol Dis*. 2019 Jan;121:205–13.
143. Huebecker M, Moloney EB, Van Der Spoel AC, Priestman DA, Isacson O, Hallett PJ, et al. Reduced sphingolipid hydrolase activities, substrate accumulation and ganglioside decline in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 2019 Nov 8;14(1).
144. Chiasserini D, Paciotti S, Eusebi P, Persichetti E, Tasegian A, Kurzawa-Akanbi M, et al. Selective loss of glucocerebrosidase activity in sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Mol Neurodegener*. 2015 Dec 27;10(1):15.
145. Atashrazm F, Hammond D, Perera G, Dobson-Stone C, Mueller N, Pickford R, et al. Reduced glucocerebrosidase activity in monocytes from patients with Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2018 Oct 18;8(1):15446.
146. Alcalay RN, Levy OA, Waters CC, Fahn S, Ford B, Kuo SH, et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain*. 2015 Sep 1;138(Pt 9):2648–58.
147. Pchelina S, Baydakova G, Nikolaev M, Senkevich K, Emelyanov A, Kopytova A, et al. Blood lysosphingolipids accumulation in patients with parkinson's disease with glucocerebrosidase 1 mutations. *Movement Disorders*. 2018 Aug 1;33(8):1325–30.
148. Parnetti L, Chiasserini D, Persichetti E, Eusebi P, Varghese S, Qureshi MM, et al. Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2014 Jul 16;29(8):1019–27.
149. Parnetti L, Paciotti S, Eusebi P, Dardis A, Zampieri S, Chiasserini D, et al. Cerebrospinal fluid β -glucocerebrosidase activity is reduced in parkinson's disease patients. *Movement Disorders*. 2017 Oct 26;32(10):1423–31.
150. Balducci C, Pierguidi L, Persichetti E, Parnetti L, Sbaragli M, Tassi C, et al. Lysosomal hydrolases in cerebrospinal fluid from subjects with Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2007 Jul 30;22(10):1481–4.
151. Lerche S, Schulte C, Wurster I, Machetanz G, Roeben B, Zimmermann M, et al. The Mutation Matters: CSF Profiles of GCase, Sphingolipids, α -Synuclein in PDGBA. *Mov Disord*. 2021 May 1;36(5):1216–28.
152. van Dijk KD, Persichetti E, Chiasserini D, Eusebi P, Beccari T, Calabresi P, et al. Changes in endolysosomal enzyme activities in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2013 Jun 27;28(6):747–54.
153. Hallett PJ, Huebecker M, Brekk OR, Moloney EB, Rocha EM, Priestman DA, et al. Glycosphingolipid levels and glucocerebrosidase activity are altered in normal aging of the mouse brain. *Neurobiol Aging*. 2018 Jul 1;67:189–200.
154. Alcalay RN, Wolf P, Chiang MSR, Helesicova K, Zhang XK, Merchant K, et al. Longitudinal Measurements of Glucocerebrosidase activity in Parkinson's patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020 Oct 5;7(10):1816–30.

155. Oftedal L, Maple-Grødem J, Dalen I, Tysnes OB, Pedersen KF, Alves G, et al. Association of CSF Glucocerebrosidase Activity With the Risk of Incident Dementia in Patients With Parkinson Disease. *Neurology*. 2023 Jan 24;100(4).
156. Omer N, Giladi N, Gurevich T, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Glinka T, et al. Glucocerebrosidase Activity is not Associated with Parkinson's Disease Risk or Severity. *Movement Disorders*. 2022 Jan 22;37(1):190–5.
157. Aldridge CM. Low Glucocerebrosidase Activity Predicts Dementia in Parkinson Disease. *Neurology*. 2023 Jan 24;100(4):169–70.
158. Milenkovic I, Blumenreich S, Futerman AH. GBA mutations, glucosylceramide and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2022 Feb 1;72:148–54.
159. Sud M, Fahy E, Cotter D, Brown A, Dennis EA, Glass CK, et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan 3;35:D527–32.
160. Dasgupta S, Ray SK. Diverse Biological Functions of Sphingolipids in the CNS: Ceramide and Sphingosine Regulate Myelination in Developing Brain but Stimulate Demyelination during Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *J Neurol Psychol*. 2017 Dec 30;5(1):01–7.
161. Zhang T, de Waard AA, Wuhrer M, Spaapen RM. The Role of Glycosphingolipids in Immune Cell Functions. *Front Immunol*. 2019 Jan 29;10.
162. Grassi S, Prioni S, Cabitta L, Aureli M, Sonnino S, Prinetti A. The Role of 3-O-Sulfogalactosylceramide, Sulfatide, in the Lateral Organization of Myelin Membrane. *Neurochem Res*. 2016 Feb 5;41(1–2):130–43.
163. Farfel-Becker T, Vitner EB, Kelly SL, Bame JR, Duan J, Shinder V, et al. Neuronal accumulation of glucosylceramide in a mouse model of neuronopathic Gaucher disease leads to neurodegeneration. *Hum Mol Genet*. 2014 Feb 15;23(4):843–54.
164. Surface M, Balwani M, Waters C, Haimovich A, Gan-Or Z, Marder KS, et al. Plasma Glucosylsphingosine in GBA1 Mutation Carriers with and without Parkinson's Disease. *Movement Disorders*. 2022 Feb 6;37(2):416–21.
165. te Vrugte D, Sturchio A, Priestman DA, Tsitsi P, Hertz E, Andréasson M, et al. Glycosphingolipid Changes in Plasma in Parkinson's Disease Independent of Glucosylceramide Levels. *Movement Disorders*. 2022 Oct 25;37(10):2129–34.
166. den Heijer JM, Cullen VC, Pereira DR, Yavuz Y, de Kam ML, Grievink HW, et al. A Biomarker Study in Patients with GBA1-Parkinson's Disease and Healthy Controls. *Mov Disord*. 2023 May 1;38(5):783–95.
167. Mielke MM, Maetzler W, Haughey NJ, Bandaru VVR, Savica R, Deuschle C, et al. Plasma Ceramide and Glucosylceramide Metabolism Is Altered in Sporadic Parkinson's Disease and Associated with Cognitive Impairment: A Pilot Study. *PLoS One*. 2013 Sep 18;8(9):e73094.
168. Guedes LC, Chan RB, Gomes MA, Conceição VA, Machado RB, Soares T, et al. Serum lipid alterations in GBA-associated Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017 Nov;44:58–65.
169. Galvagnion C, Marlet FR, Cerri S, Schapira AH V, Blandini F, Di Monte DA. Sphingolipid changes in Parkinson L444P GBA mutation fibroblasts promote α -synuclein aggregation. *Brain*. 2022 Apr 29;145(3):1038–51.

170. Blumenreich S, Nehushtan T, Barav OB, Saville JT, Dingjan T, Hardy J, et al. Elevation of gangliosides in four brain regions from Parkinson's disease patients with a GBA mutation. *NPJ Parkinsons Dis.* 2022 Aug 6;8(1):99.
171. Boutin M, Sun Y, Shacka JJ, Auray-Blais C. Tandem Mass Spectrometry Multiplex Analysis of Glucosylceramide and Galactosylceramide Isoforms in Brain Tissues at Different Stages of Parkinson Disease. *Anal Chem.* 2016 Feb 2;88(3):1856–63.
172. Huh YE, Park H, Chiang MSR, Tuncali I, Liu G, Locascio JJ, et al. Glucosylceramide in cerebrospinal fluid of patients with GBA-associated and idiopathic Parkinson's disease enrolled in PPMI. *NPJ Parkinsons Dis.* 2021 Dec 1;7(1).
173. Niimi Y, Mizutani Y, Akiyama H, Watanabe H, Shiroki R, Hirabayashi Y, et al. Cerebrospinal Fluid Profiles in Parkinson's Disease: No Accumulation of Glucosylceramide, but Significant Downregulation of Active Complement C5 Fragment. *J Parkinsons Dis.* 2021;11(1):221–32.
174. Lerche S, Wurster I, Valente EM, Avenali M, Samaniego D, Martínez-Vicente M, et al. CSF d18:1 sphingolipid species in Parkinson disease and dementia with Lewy bodies with and without GBA1 variants. *NPJ Parkinsons Dis.* 2024 Oct 24;10(1):198.
175. Matsumoto S ichi, Sato S, Otake K, Kosugi Y. Highly-sensitive simultaneous quantitation of glucosylsphingosine and galactosylsphingosine in human cerebrospinal fluid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2022 Aug;217:114852.
176. Muñoz SS, Petersen D, Marlet FR, Kücükköse E, Galvagnion C. The interplay between Glucocerebrosidase, α -synuclein and lipids in human models of Parkinson's disease. *Biophys Chem.* 2021 Jun;273:106534.
177. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Mass spectrometry in the clinical laboratory: General principles and guidance (C50-A). 2007.
178. The European Parliament. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU; 2017. Available from: <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng>.
179. Nakajima K, Akiyama H, Tanaka K, Kohyama-Koganeya A, Greimel P, Hirabayashi Y. Separation and analysis of mono-glucosylated lipids in brain and skin by hydrophilic interaction chromatography based on carbohydrate and lipid moiety. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016 Sep 15;1031:146–53.
180. Zheng K, Ji A, Chung LL, Culm-Merdek K, Liu H, Richards S, et al. Enhancement of human plasma glucosylceramide assay sensitivity using delipidized plasma. *Mol Genet Metab Rep.* 2016 Sep 1;8:77–9.
181. Mutoh T, Niimi Y, Ito S, Akiyama H, Shiroki R, Hirabayashi Y, et al. A pilot study assessing sphingolipids and glycolipids dysmetabolism in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023 Jan;639:84–90.
182. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 2009 Feb;30(1):19–34.
183. Suzuki A, Nitta T, Silsirivanit A, et al. Relative content analysis of glycosphingolipids by liquid chromatography-mass spectrometry with multiple reaction monitoring. 2021 Sep 25 [Updated 2022 Feb 27]. In: Nishihara S, Angata K, Aoki-Kinoshita KF, et al., editors.

Glycoscience Protocols (GlycoPOD) - second edition. Saitama (JP): Japan Consortium for Glycobiology and Glycotechnology. 2021.

184. Luberto C, Haley JD, Del Poeta M. Imaging with mass spectrometry, the next frontier in sphingolipid research? A discussion on where we stand and the possibilities ahead. *Chem Phys Lipids*. 2019 Mar;219:1–14.
185. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Liquid chromatography–mass spectrometry methods (C62-A) — Second edition. 2022.
186. Sidhu R, Mikulka CR, Fujiwara H, Sands MS, Schaffer JE, Ory DS, et al. A HILIC-MS/MS method for simultaneous quantification of the lysosomal disease markers galactosylsphingosine and glucosylsphingosine in mouse serum. *Biomed Chromatogr*. 2018 Jul 1;32(7).
187. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem*. 2012 Jan 31;402(1):231–47.
188. Polo G, Burlina AP, Kolamunnage TB, Zampieri M, Dionisi-Vici C, Strisciuglio P, et al. Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2017 Jan 1;55(3).
189. Pettazzoni M, Froissart R, Pagan C, Vanier MT, Ruet S, Latour P, et al. LC-MS/MS multiplex analysis of lysosphingolipids in plasma and amniotic fluid: A novel tool for the screening of sphingolipidoses and Niemann-Pick type C disease. *PLoS One*. 2017 Jul 27;12(7):e0181700.
190. Gathungu RM, Larrea P, Sniatynski MJ, Marur VR, Bowden JA, Koelmel JP, et al. Optimization of Electrospray Ionization Source Parameters for Lipidomics To Reduce Misannotation of In-Source Fragments as Precursor Ions. *Anal Chem*. 2018 Nov 20;90(22):13523–32.
191. Lipidomics Standard Initiative (LSI). Lipidomics standards [Internet]. Available from: <https://lipidomicstandards.org/>.
192. Peng B, Kopczynski D, Pratt BS, Ejsing CS, Burla B, Hermansson M, et al. LipidCreator workbench to probe the lipidomic landscape. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1).
193. Lee CY, Lesimple A, Larsen Å, Mamer O, Genest J. ESI-MS quantitation of increased sphingomyelin in Niemann-Pick disease type B HDL. *J Lipid Res*. 2005 Jun;46(6):1213–28.
194. Köfeler HC, Ahrends R, Baker ES, Ekroos K, Han X, Hoffmann N, et al. Recommendations for good practice in MS-based lipidomics. *J Lipid Res*. 2021;62:100138.
195. Höring M, Ekroos K, Baker PRS, Connell L, Stadler SC, Burkhardt R, et al. Correction of Isobaric Overlap Resulting from Sodiated Ions in Lipidomics. *Anal Chem*. 2020 Aug 18;92(16):10966–70.
196. Morin LP, Mess JN, Furtado M, Garofolo F. Reliable procedures to evaluate and repair crosstalk for bioanalytical MS/MS assays. *Bioanalysis*. 2011 Feb;3(3):275–83.
197. Patel B, Suhagia BN, Jangid AG, Mistri HN, Desai N. Systematic evaluation of matrix effect and cross-talk-free method for simultaneous determination of zolmitriptan and N-desmethyl zolmitriptan in human plasma: A sensitive LC-MS/MS method validation and its application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*. 2016 Mar 27;30(3):447–58.
198. Millán L, Fernández-Irigoyen J, Santamaría E, Mayo R. Mass Spectrometry Applied to Human Cerebrospinal Fluid Lipidome. *Methods Mol Biol*. 2019;2044:353–61.

199. Aldana J, Romero-otero A, Cala MP. Exploring the Lipidome: Current Lipid Extraction Techniques for Mass Spectrometry Analysis. *Metabolites*. 2020 Jun 1;10(6):1–32.
200. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959 Aug 1;37(8):911–7.
201. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957 May;226(1):497–509.
202. Basit A, Piomelli D, Armirotti A. Rapid evaluation of 25 key sphingolipids and phosphosphingolipids in human plasma by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2015 Jul 1;407(17):5189–98.
203. Reichl B, Eichelberg N, Freytag M, Gojo J, Peyrl A, Buchberger W. Evaluation and optimization of common lipid extraction methods in cerebrospinal fluid samples. *Journal of Chromatography B*. 2020 Sep;1153:122271.
204. Bettoui T, Chipeaux C, Ben Arfa K, Héron S, Belmatoug N, Franco M, et al. Development of a new online SPE-HPLC-MS/MS method for the profiling and quantification of sphingolipids and phospholipids in red blood cells – Application to the study of Gaucher’s disease. *Anal Chim Acta*. 2023 Oct;1278:341719.
205. Züllig T, Trötz Müller M, Köfeler HC. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Anal Bioanal Chem*. 2020 Apr 10;412(10):2191–209.
206. McCalley D V. Managing the column equilibration time in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A*. 2020 Feb;1612:460655.
207. Liebisch G, Ahrends R, Arita M, Arita M, Bowden JA, Ejsing CS, et al. Lipidomics needs more standardization. *Nat Metab*. 2019 Jul 29;1(8):745–7.
208. Kopczynski D, Ejsing CS, McDonald JG, Bamba T, Baker ES, Bertrand-Michel J, et al. The lipidomics reporting checklist a framework for transparency of lipidomic experiments and repurposing resource data. *J Lipid Res*. 2024 Sep;65(9):100621.
209. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). M10 Bioanalytical method validation. Step 5, European Medicines Agency (EMA/CHMP/ICH/172948/2019); 2022.
210. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Bioanalytical method validation: Guidance for industry; 2018. .
211. Dirks NF, Ackermans MT, Martens F, Cobbaert CM, de Jonge R, Heijboer AC. We need to talk about the analytical performance of our laboratory developed clinical LC-MS/MS tests, and start separating the wheat from the chaff. *Clinica Chimica Acta*. 2021 Mar;514:80–3.
212. Krueve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Anal Chim Acta*. 2015 Apr;870:8–28.
213. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem*. 2003 Jul 1;75(13):3019–30.

214. Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2003 Nov 1;14(11):1290–4.
215. King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2000 Nov 1;11(11):942–50.
216. Panuwet P, Hunter RE, D’Souza PE, Chen X, Radford SA, Cohen JR, et al. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Crit Rev Anal Chem*. 2016 Mar 3;46(2):93–105.
217. Xia Y, Jemal M. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2009 Jul 30;23(14):2125–38.
218. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2005 Apr;38(4):328–34.
219. Bonfiglio R, King RC, Olah T V., Merkle K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1999 Jun 30;13(12):1175–85.
220. Müller C, Schäfer P, Störtzel M, Vogt S, Weinmann W. Ion suppression effects in liquid chromatography–electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. *Journal of Chromatography B*. 2002 Jun;773(1):47–52.
221. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal Chem*. 1998 Mar 1;70(5):882–9.
222. Trivedi V, Upadhyay V, Yadav M, Shrivastav PS, Sanyal M. Impact of Electrospray Ion Source Platforms on Matrix Effect Due to Plasma Phospholipids in The Determination of Rivastigmine by LC–MS/MS. *Bioanalysis*. 2014 Aug 10;6(17):2301–16.
223. Cortese M, Gigliobianco MR, Magnoni F, Censi R, Di Martino P. Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. *Molecules*. 2020 Jul 3;25(13):3047.
224. De Nicolò A, Cantù M, D’Avolio A. Matrix Effect Management in Liquid Chromatography Mass Spectrometry: The Internal Standard Normalized Matrix Effect. *Bioanalysis*. 2017 Jul 24;9(14):1093–105.
225. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B*. 2007 Jun;852(1–2):22–34.
226. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach (EP06-A) — Second edition. 2020.

227. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures (EP17-A2) — Second edition. 2012.
228. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of precision of quantitative measurement procedures (EP05-A3) — Third edition. 2014.
229. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples (EP09) — Third edition. 2018.
230. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). User verification of precision and estimation of bias (EP15-A3) — Third edition. 2014.
231. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Preliminary Evaluation of Quantitative Medical Laboratory Measurement Procedures (EP10) — Fourth Edition. 2024.
232. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry (NBS04) — Second edition. 2017.
233. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference Testing in Clinical Chemistry (EP07) — Third edition. 2018.
234. Matuszewski BK. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC–MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B*. 2006 Jan;830(2):293–300.
235. Avery MJ. Quantitative characterization of differential ion suppression on liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometric bioanalytical methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2003 Feb 15;17(3):197–201.
236. Kumar D, Gautam N, Alnouti Y. Analyte recovery in LC-MS/MS bioanalysis: An old issue revisited. *Anal Chim Acta*. 2022 Mar;1198:339512.
237. Ghosh C. Relative matrix effects: A step forward using standard line slopes and ANOVA analysis. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019 Nov;12(7):1378–86.
238. Rudzki PJ, Gniazdowska E, Buś-Kwaśnik K. Quantitative evaluation of the matrix effect in bioanalytical methods based on LC–MS: A comparison of two approaches. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 Jun;155:314–9.
239. Gniazdowska E, Giebułtowski J, Rudzki PJ. How does the order of sample analysis influence the matrix effect during LC-MS bioanalysis? *Journal of Chromatography B*. 2023 Jul;1227:123800.
240. Krueve A, Leito I, Herodes K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. *Anal Chim Acta*. 2009 Sep;651(1):75–80.
241. del Campo M, Mollenhauer B, Bertolotto A, Engelborghs S, Hampel H, Simonsen AH, et al. Recommendations to Standardize Preanalytical Confounding Factors in Alzheimer’s and Parkinson’s Disease Cerebrospinal Fluid Biomarkers: An Update. *Biomark Med*. 2012 Aug 23;6(4):419–30.
242. European Medicines Agency (EMA). Guideline on bioanalytical method validation. (EMA/CHMP/EWP/192217/2009); 2011.
243. Bienvenu JF, Provencher G, Bélanger P, Bérubé R, Dumas P, Gagné S, et al. Standardized Procedure for the Simultaneous Determination of the Matrix Effect, Recovery, Process Efficiency, and Internal Standard Association. *Anal Chem*. 2017 Jul 18;89(14):7560–8.

244. Gorrochategui E, Casas J, Porte C, Lacorte S, Tauler R. Chemometric strategy for untargeted lipidomics: Biomarker detection and identification in stressed human placental cells. *Anal Chim Acta*. 2015 Jan;854:20–33.
245. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism. *Neurology*. 1967 May;17(5):427–427.
246. Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, Stebbins GT, Fahn S, Martinez-Martin P, et al. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Scale presentation and clinimetric testing results. *Movement Disorders*. 2008 Nov 15;23(15):2129–70.
247. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A Brief Screening Tool For Mild Cognitive Impairment. *J Am Geriatr Soc*. 2005 Apr 30;53(4):695–9.
248. Gonzalez-Sepulveda M, Laguna A, Carballo-Carbajal I, Galiano-Landeira J, Romero-Gimenez J, Cuadros T, et al. Validation of a Reversed Phase UPLC-MS/MS Method to Determine Dopamine Metabolites and Oxidation Intermediates in Neuronal Differentiated SH-SY5Y Cells and Brain Tissue. *ACS Chem Neurosci*. 2020 Sep 2;11(17):2679–87.
249. Gehrlein A, Udayar V, Anastasi N, Morella ML, Ruf I, Brugger D, et al. Targeting neuronal lysosomal dysfunction caused by β -glucocerebrosidase deficiency with an enzyme-based brain shuttle construct. *Nat Commun*. 2023 Apr 12;14(1):2057.
250. Migdalska-Richards A, Schapira AH V. The relationship between glucocerebrosidase mutations and Parkinson disease. *J Neurochem*. 2016 Oct 10;139(S1):77–90.
251. Piraud M, Pettazoni M, Lavoie P, Ruet S, Pagan C, Cheillan D, et al. Contribution of tandem mass spectrometry to the diagnosis of lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2018 May 19;41(3):457–77.
252. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Q2(R2) Validation of analytical procedures. Step 5, European Medicines Agency (EMA/CHMP/ICH/82072/2006); 2022.
253. Evard H, Krue A, Leito I. Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part I: Theoretical review. *Anal Chim Acta*. 2016 Oct;942:23–39.
254. Kollipara S, Bende G, Agarwal N, Varshney B, Paliwal J. International Guidelines for Bioanalytical Method Validation: A Comparison and Discussion on Current Scenario. *Chromatographia*. 2011 Feb 8;73(3–4):201–17.
255. Auray-Blais C, Boutin M. Novel Gb3 Isoforms Detected in Urine of Fabry Disease Patients: A Metabolomic Study. *Curr Med Chem*. 2012 May 1;19(19):3241–52.
256. Abaoui M, Boutin M, Lavoie P, Auray-Blais C. Tandem mass spectrometry multiplex analysis of methylated and non-methylated urinary Gb3 isoforms in Fabry disease patients. *Clinica Chimica Acta*. 2016 Jan;452:191–8.
257. Boutin M, Auray-Blais C. Metabolomic Discovery of Novel Urinary Galabiosylceramide Analogs as Fabry Disease Biomarkers. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2015 Mar 1;26(3):499–510.
258. Liang HR, Foltz RL, Meng M, Bennett P. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and

- stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(24):2815–21.
259. Remane D, Meyer MR, Wissenbach DK, Maurer HH. Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionizat. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2010 Nov 15;24(21):3103–8.
 260. Zhou W, Yang S, Wang PG. Matrix Effects and Application of Matrix Effect Factor. *Bioanalysis*. 2017 Dec 24;9(23):1839–44.
 261. Charrière K, Pazart L. Clinical evidence requirements according to the IVDR 2017/746: practical tools and references for underpinning clinical evidence of IVD-MDs. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2023 Jun 27;61(7):1150–7.
 262. Horgan D, Plebani M, Orth M, Macintyre E, Jackson S, Lal JA, et al. The gaps between the new EU legislation on in vitro diagnostics and the on-the-ground reality. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2023 Jan 27;61(2):224–33.
 263. Vogeser M, Brüggemann M. Complex analytical procedures in diagnostic laboratories and the IVDR. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2021 Feb 23;59(3):457–8.
 264. International Organization for Standardization. ISO 15189:2022 [Internet - cited 2023 Feb 4]. Available from: <https://www.iso.org/fr/standard/76677.html>.
 265. Vanstapel FJLA, Orth M, Streichert T, Capoluongo ED, Oosterhuis WP, Çubukçu HC, et al. ISO 15189 is a sufficient instrument to guarantee high-quality manufacture of laboratory developed tests for in-house-use conform requirements of the European In-Vitro-Diagnostics Regulation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2023 Mar 28;61(4):608–26.
 266. Boursier G, Vukasovic I, Brguljan PM, Lohmander M, Ghita I, Bernabeu Andreu FA, et al. Accreditation process in European countries – an EFLM survey. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2016 Jan 1;54(4).
 267. Plebani M, Cadamuro J, Vermeersch P, Jovičić S, Ozben T, Trenti T, et al. A vision to the future: value-based laboratory medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2024 Nov 26;62(12):2373–87.
 268. Maurer HH. Advances in analytical toxicology: The current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid. Vol. 381, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005. p. 110–8.
 269. Fanning S, Selkoe D, Dettmer U. Parkinson's disease: proteinopathy or lipidopathy? *NPJ Parkinsons Dis*. 2020 Jan 3;6(1):3.
 270. Menozzi E, Del Pozo SL, Macnaughtan J, Mezabrovski R, Koletsi S, Mitrotti P, et al. Severe GBA1 variants drive the GBA-PD clinical phenotype: implications for counselling and clinical trials (preprint). 2024.
 271. Senkevich K, Gan-Or Z. Autophagy lysosomal pathway dysfunction in Parkinson's disease; evidence from human genetics. *Parkinsonism Relat Disord*. 2020 Apr;73:60–71.

272. Gleason A, Tayebi N, Lopez G, Sidransky E. No Evidence That Glucosylsphingosine Is a Biomarker for Parkinson's Disease: Statistical Differences Do Not Necessarily Indicate Biological Significance. *Movement Disorders*. 2022 Mar 24;37(3):653–653.
273. Fraser CG. *Biological variation : from principles to practice*. Washington, DC: AACC Press; 2001.
274. Coskun A. Are Your Laboratory Data Reproducible? The Critical Role of Imprecision from Replicate Measurements to Clinical Decision-making. *Ann Lab Med*. 2025 May 1;45(3):259–71.
275. Korff A, Liu C, Gingham C, Shi M, Zhang J. α -Synuclein in Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013 Aug 5;36(4):679–88.
276. Shi M, Bradner J, Hancock AM, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann Neurol*. 2011 Mar 11;69(3):570–80.
277. Barkovits K, Kruse N, Linden A, Tönges L, Pfeiffer K, Mollenhauer B, et al. Blood Contamination in CSF and Its Impact on Quantitative Analysis of Alpha-Synuclein. *Cells*. 2020 Feb 5;9(2):370.
278. Paciotti S, Stoops E, François C, Bellomo G, Eusebi P, Vanderstichele H, et al. Cerebrospinal fluid hemoglobin levels as markers of blood contamination: relevance for α -synuclein measurement. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2021 Sep 27;59(10):1653–61.
279. Vieira SRL, Mezabrovski R, Toffoli M, Del Pozo SL, Menozzi E, Mullin S, et al. Consensus Guidance for Genetic Counseling in GBA1 Variants: A Focus on Parkinson's Disease. *Movement Disorders*. 2024 Dec 11;39(12):2144–54.
280. Petrucci S, Ginevrino M, Trezzi I, Monfrini E, Ricciardi L, Albanese A, et al. GBA-Related Parkinson's Disease: Dissection of Genotype–Phenotype Correlates in a Large Italian Cohort. *Movement Disorders*. 2020 Nov 13;35(11):2106–11.
281. Chahine LM, Merchant K, Siderowf A, Sherer T, Tanner C, Marek K, et al. Proposal for a Biologic Staging System of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*. 2023 Mar 13;13(3):297–309.
282. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2018 Apr;14(4):535–62.
283. Alecu I, Bennett SAL. Dysregulated Lipid Metabolism and Its Role in α -Synucleinopathy in Parkinson's Disease. *Front Neurosci*. 2019 Apr 11;13.

11

Anexo

11.1. PUBLICACIONES EN EL MARCO DE LA TESIS

11.1.1. Primera autora.

Castillo-Ribelles, L., Arranz-Amo, J. A., Hernández-Vara, J., Samaniego-Toro, D., Enriquez-Calzada, S., Pozo, S. L., Camprodon-Gomez, M., Laguna, A., Gonzalo, M. A., Ferrer, R., Martinez-Vicente, M., Carnicer-Caceres, C. (2024). Evaluation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Analysis of Glucosylceramide and Galactosylceramide Isoforms in Cerebrospinal Fluid of Parkinson's Disease Patients. *Analytical Chemistry*, 96(31), 12875–12882. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c02654>

Analytical Chemistry

Q1 JIF: 6.7, SJR: 1.533

Castillo-Ribelles, L., Arranz-Amo, J. A., Hernández-Vara, J., Ferrer-Costa, R., Martinez-Vicente, M., Carnicer-Caceres, C. (2025). Systematic Assessment of Matrix Effect, Recovery and Process Efficiency Using Three Complementary Approaches: Implications for LC-MS/MS Bioanalysis Applied to Glucosylceramides in Human Cerebrospinal Fluid. *ACS Omega*, XXXX, XXX, XXX-XXX. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c05399>

ACS Omega

Q1 JIF: 4.3, SJR: 0.773

11.1.2. Autora colaboradora.

Navarro-Romero, A., Fernandez-Gonzalez, I., Riera, J., Montpeyo, M., Albert-Bayo, M., Lopez-Royo, T., Castillo-Sanchez, P., Carnicer-Caceres, C., Arranz-Amo, J. A., Castillo-Ribelles, L., Pradas, E., Casas, J., Vila, M., Martinez-Vicente, M. (2022). Lysosomal lipid alterations caused by glucocerebrosidase deficiency promote lysosomal dysfunction, chaperone-mediated-autophagy deficiency, and alpha-synuclein pathology. *NPJ Parkinson's disease*, 8(1), 126. <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00397-6>

npj Parkinsons Disease

Q1 JIF: 8.2, SJR: 2.914

11.2. COMUNICACIONES EN EL MARCO DE LA TESIS

Dysregulation of the autophagic-lysosomal pathway in Parkinson's disease associated to GBA.

Montpeyó, M., Navarro-Romero, A., Fernandez-Gonzalez, I., Riera, J., Pradas, E., Carnicer-Cáceres, C., Arranz-Amo, J.A., Castillo-Ribelles, L., Garcia-Collazo, A.M., Perez-Carmona, N., Ruano, A., Delgado, A., Morales, S., Cubero, E., Barril, X., Martinez-Vicente, M.

SENC Meeting 2021, Lleida, España. 11/10/2021-04/11/2021

Development of an LC-MS/MS method for the multiplex quantification of sphingolipids in brain tissue of Parkinson's disease mouse model. Castillo-Ribelles, L., Arranz-Amo, J.A., Martinez-Vicente, M., Montpeyó, M., Riera, J., Pradas, E., Carnicer-Cáceres, C.

Worldlab-Euromedlab 2023, Roma, Italia. 21/05/2023-25/05/2023

<https://doi.org/10.1515/cclm-2023-7043>

Lysosomal lipid alterations caused by glucocerebrosidase deficiency promote lysosomal dysfunction, chaperone mediated- autophagy deficiency, and alpha-synuclein pathology

Pradas-Gracia, E., Navarro-Romero, A., Fernandez-Gonzalez, I., Montpeyó, M., Riera, J., Arrue-Gonzalo, M., Arranz-Amo, J.A., Carnicer-Cáceres, C., Castillo-Ribelles, L., Martinez-Vicente, M.

World Parkinson Congress 2023, Barcelona, España. 04/07/2023-07/07/2023

nanoGBA-to-brain strategy as a novel Parkinson's disease treatment. Castillo-Sanchez, P.,

Pradas, E., Arrue-Gonzalo, M., Tanco, S., Sarlé-Vallés, P., Montpeyó, D., Basanta, N., Conejero, I., Riera, J., Montpeyó, M., Navarro-Romero, A., Carnicer-Cáceres, C., Arranz-Amo, J.A., Castillo-Ribelles, L., Novio, F., Vicent, M.J., Lorenzo, J., Martinez-Vicente, M.

SEFAGIA 2024, Jarandilla de la Vera, Extremadura. 03/04/2024-05/04/2024

Dysregulation of the autophagic-lysosomal pathway in Parkinson's disease associated to GBA.

Arrue-Gonzalo, M., Pradas, E., Castillo-Sanchez, P., Montpeyó, D., Sarlé, P., Riera, J., Montpeyó, M., Hernandez-Vara, J., Laguna, A., Camprodon-Gomez, M., Enriquez-Calzada, S., Samaniego, D., Castillo-Ribelles, L., Carnicer-Cáceres, C., Arranz-Amo, J.A., Novio, F., Conejos, I., Tanco, S., Vicent, M.J., Lorenzo, J., Martinez-Vicente, M.

Gordon Research Conferences: Autophagy in Stress, Development and Disease. Lucca, Italia 11-15/03/2024

NanoERT: engineering next-generation Enzyme Replacement Therapies for GBA1-related pathologies. Pradas E., Castillo-Sanchez P., Arrue-Gonzalez M., Tanco S., Sarle P., Rodriguez-Carreras P , Riera J., Carnicer-Caceres C., Castillo-Ribelles L., Medel M., Conejero I., Novio F.,

Vicent M.J., Lorenzo J., Martinez-Vicente M.

GBA1 Meeting 2025, Canada, 04/06/2025- 07/06/2025

Enhanced Intravenous Enzyme Replacement Therapy for Gaucher Disease Using a GBA-Polymer Nanoconjugate. Azaustre-Garcia A; Pradas E; Tanco S; Sarlé-Vallés P; Castillo-Sánchez P; Arrúe-Gonzalez M; Riera J; Navarro-Romero A; Carnicer-Cáceres C; ArranzAmo JA; Castillo-Ribelles L; Novio F; Vicent MJ; Martinez-Vicente M; Lorenzo J.

XXI Jornada Científica del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular