



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Influencia del Azafrán en Enfermos de  
Esclerosis Múltiple**

**Dña. María José Bagur Fuster  
2018**





D<sup>a</sup>. Magdalena Martínez Tomé, Profesor Titular de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología en el Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Influencia del azafrán en enfermos de Esclerosis Múltiple", realizada por D<sup>a</sup>. María José Bagur Fuster, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 20 de septiembre de 2018





D<sup>a</sup>. Antonia María Jiménez Monreal, Profesor Contratado Doctor de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología en el Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Influencia del azafrán en enfermos de Esclerosis Múltiple", realizada por D<sup>a</sup>. María José Bagur Fuster, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 20 de septiembre de 2018





D. Gonzalo Luis Alonso Díaz-Marta, Profesor Titular de Universidad del Área de Edafología y Química Agrícola en el Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética, de la Universidad de Castilla La Mancha, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Influencia del azafrán en enfermos de Esclerosis Múltiple", realizada por D<sup>a</sup>. María José Bagur Fuster, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 20 de septiembre de 2018



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que esta tesis oliera a azafrán, flor de un día que precisa ser tratada suavemente y que encierra secretos que esperan ser descubiertos.

Eternamente agradecida a los enfermos de esclerosis múltiple, especialmente a la Asociación Española de Esclerosis Múltiple de Albacete. Ellos saben lo que es luchar.

Agradezco a la Universidad de Murcia que me acogió en su Programa de Doctorado y a todas las personas que me han facilitado el trabajo y me han ayudado en el desarrollo de esta tesis, especialmente a Magdalena Martínez Tomé y a Antonia M<sup>a</sup> Jiménez Monreal por su dirección, paciencia y sabiduría.

Gracias a la Universidad de Castilla La Mancha, por todo lo que me ha dado y sigue dando. Nada hubiera sido posible sin la ayuda de Gonzalo Alonso Díaz-Marta que me ha enseñado mucho y no sólo del azafrán. Mi familia agradece, como tú y tu familia, me habéis cuidado. Gracias Amaya, Ana, Candi, Kortés, Mercedes, Natalia, Ro, Rosario y Valle, también Amalia, mis compañeras en el Departamento de Química Agrícola de la UCLM, sois especiales, nunca olvidaré vuestro apoyo. Todas las personas que pasan por ese laboratorio tienen una ilusión y entusiasmo contagioso, debe ser cosa del azafrán y el vino. No quiero olvidar a Joaquín, que ha leído la tesis casi antes que nadie.

Esta tesis va dedicada a los valientes: mi madre, mi hermano y mi hermana. También a mi padre al que le debo la curiosidad y la osadía.

Sin Juanjo no hubiera podido, gracias siempre. No sé si mis hijas leerán este trabajo, pero quiero pedirles que consuman azafrán, y que recuerden que nadie es más que nadie, pero tampoco menos.



## ÍNDICE

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. AZAFRÁN Y SALUD</b>	<b>3</b>
1.1.1. Composición química del azafrán	4
1.1.2. Farmacocinética del azafrán: bioaccesibilidad y biodisponibilidad	11
1.1.3. Bioactividad del azafrán	16
1.1.4. Azafrán como fuente de productos antioxidantes	19
1.1.5. Actividad del azafrán sobre el sistema nervioso central y sistema nervioso periférico	24
1.1.6. Actividad del azafrán sobre otras enfermedades	30
1.1.7. Azafrán como alimento funcional. Dosificación para una intervención nutricional	35
<b>1.2. ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b>	<b>38</b>
1.2.1. Sintomatología	40
1.2.2. Diagnóstico	42
1.2.3. Formas clínicas	44
1.2.4. Tratamiento	47
<b>1.3. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA INFLUENCIA DE LA DIETA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b>	<b>51</b>
1.3.1. Patrón dietético, consumo de energía y nutrientes	56
1.3.2. Variaciones estacionales	56
1.3.3. Malnutrición y análisis clínicos	57
1.3.4. Suplementos dietéticos	57

1.3.5. Ácidos grasos saturados	58
1.3.6. Vitamina D	60
1.3.7. Otras vitaminas y antioxidantes	62
1.3.8. Antropometría, cuestionarios dietéticos y parámetros bioquímicos	64
<b>1.4. CALIDAD DE VIDA Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b>	<b>66</b>
1.4.1. Cuestionarios genéricos para la valoración de calidad de vida	69
1.4.2. Cuestionario específico para la valoración de calidad de vida	70
1.4.3. Valoración de la independencia en las actividades básicas de la vida diaria	71
1.4.4. Valoración del equilibrio y marcha: Test de Tinetti	73
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>75</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>77</b>
<b>3.1. AZAFRÁN</b>	<b>79</b>
3.1.1. Especia, materiales y equipos analíticos del azafrán	79
3.1.2. Fundamento y metodología de análisis del azafrán	80
3.1.3. Preparación de las infusiones del azafrán especia	85
3.1.4. Envasado del azafrán	87
3.1.5. Determinación de la estabilidad de los compuestos a lo largo del estudio	88
3.1.6. Tratamiento de los datos	89
<b>3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO</b>	<b>89</b>
3.2.1. Selección de la población	89
3.2.2. Planificación del estudio	90

<b>3.3. MEDIDAS DEL ESTADO NUTRICIONAL</b>	<b>92</b>
3.3.1. Parámetros bioquímicos	92
3.3.2. Medidas antropométricas	93
3.3.3. Cuestionarios de ingesta dietética	97
<b>3.4. MEDIDA DE LA CALIDAD DE VIDA</b>	<b>99</b>
3.4.1. Instrumento Europeo de Calidad de Vida (EQ-5D)	99
3.4.2. Multiple Sclerosis Quality of Life (MSQOL-54)	100
3.4.3. Índice Katz	101
3.4.4. Índice Barthel	102
3.4.5. Índice de Tinetti	104
<b>3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>105</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>109</b>
<b>4.1. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN</b>	<b>111</b>
<b>4.2. RESULTADOS DE LA CALIDAD DEL AZAFRÁN</b>	<b>113</b>
4.2.1. Estudio teórico de la concentración óptima del azafrán	113
4.2.2. Estudio cinético de la extracción de azafrán	114
4.2.3. Dosificación del azafrán especia	122
4.2.4. Caracterización del azafrán	123
<b>4.3. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL AZAFRÁN SOBRE EL ESTADO NUTRICIONAL</b>	<b>129</b>
4.3.1. Influencia de la intervención en los parámetros bioquímicos	129
4.3.2. Influencia de la intervención en los parámetros antropométricos	139
4.3.3. Influencia de la intervención nutricional en el consumo de alimentos	144

<b>4.4. INFLUENCIA DE LA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL LA CALIDAD DE VIDA</b>	<b>167</b>
4.4.1. Evaluación de la influencia del azafrán en la Calidad de Vida con el EuroQol-5D	<b>168</b>
4.4.2. Evaluación de la influencia del azafrán en la Calidad de Vida con el MSQOL-54	<b>172</b>
4.4.3. Evaluación de la influencia del azafrán en la capacidad para llevar a cabo las actividades cotidianas	<b>178</b>
4.4.4. Evaluación de la influencia del azafrán sobre el equilibrio y la Marcha: Test de Tinetti	<b>187</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>191</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>195</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>231</b>
<b>8. ABREVIATURAS</b>	<b>257</b>
<b>9. ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>261</b>
<b>10. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>265</b>
<b>11. RESUMEN</b>	<b>271</b>
<b>12. SUMMARY</b>	<b>275</b>







## ***1. INTRODUCCIÓN***



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. AZAFRÁN Y SALUD

El azafrán está formado por los estigmas desecados de la flor de *Crocus sativus* L. (Figura 1-2). El azafrán, ha sido utilizado tradicionalmente como planta medicinal por sus propiedades bioactivas sin efectos secundarios tóxicos (Alonso y col., 1998; Carmona y col., 2006a; Ulbricht y col., 2011; Hosseinzadeh y Nassiri-Asl, 2013).



Figura 1. Flor de *Crocus sativus* L.



Figura 2. Estigmas de *Crocus sativus* L.

Además, es una especia muy valorada por ser la única en aportar color, sabor y aroma a aquellas comidas o bebidas donde se añade. Debido a sus atributos organolépticos únicos y a la dificultad de su cultivo, recolección y manipulación, tiene un alto valor y es considerada la especia más cara del mundo, por este motivo y debido a su color, se le conoce con el nombre de “oro rojo” (Carmona y col., 2006a).

Se considera que un azafrán tiene mayor calidad cuanto mayor es la concentración de las sustancias responsables de conferir color, sabor y aroma. Además, la calidad del producto también se define por la ausencia de otras sustancias como son colorantes, alimentarios o no, y por el menor contenido

posible de ciertos elementos como restos florales, tierra, insectos, etc. (ISO 3632 partes 1 y 2, 2011).

El Código Alimentario Español (C.A.E.) define al azafrán como “la especia constituida por los estigmas desecados del *Crocus sativus*, L. con las tolerancias máximas de estilos y restos florales que se especifiquen para las diversas calidades en la reglamentación correspondiente. No sobrepasará las cifras máximas siguientes: humedad y materias volátiles, 15 por 100; sílice, 2 por 100; fibra bruta, 6 por 100; extracto etéreo, entre 34 y 145 por 1000”.

### **1.1.1. Composición química del azafrán**

La composición química del azafrán ha sido estudiada en detalle por distintos autores (*Tabla 1*). Su análisis químico ha mostrado la presencia de más de 150 componentes en los estigmas de azafrán (Samarghandian, 2014a). Además de sus tres tipos de compuestos principales, ésteres de crocetina, picrocrocina y safranal, en el azafrán hay presencia de otros carotenoides, carbohidratos, fibra cruda, proteínas, grasas, antocianos, flavonoides, vitaminas (riboflavina y tiamina), minerales y muchos otros elementos que confieren propiedades nutricionales y beneficiosas para la salud (Serrano y col., 2013; Alavizahed y col., 2014). Ningún parámetro nutricional se utiliza en la determinación de la calidad comercial del azafrán, la humedad es la única excepción para evitar un fraude en su peso.

Tabla 1. Composición química aproximada del azafrán especia (Lewis y col., 1981; Sampathu y col., 1984; Rios y col., 1996; Basker, 1999)

Componente	Porcentaje
Humedad	6-12
Materia mineral	4-8,5
Fibra cruda	4-5
Proteínas	10-14
Azúcares totales <sup>a</sup>	26-27
Almidón	6-7
Glucosa	7-8
Fructosa	1-2
Grasas	5-8
Gomas y dextrinas	9-10,5
Vitaminas <sup>b</sup>	0,3-138 <sup>c</sup>
Aceites esenciales	0,3

<sup>a</sup>Incluidas las procedentes de los pigmentos tras la hidrólisis; <sup>b</sup>Riboflavina y tiamina; <sup>c</sup>en µg/g

En los frescos encontrados en la isla de Santorini, datados en 1627 (AC), puede observarse una ofrenda de estigmas de algún tipo de crocus (*Crocus sativus* o *Crocus cartwrightianus*) a la diosa Thera, que las investigaciones de Ferrence y Bendersky (2004) atribuyen a la consideración de las propiedades curativas del azafrán (Figura 3).

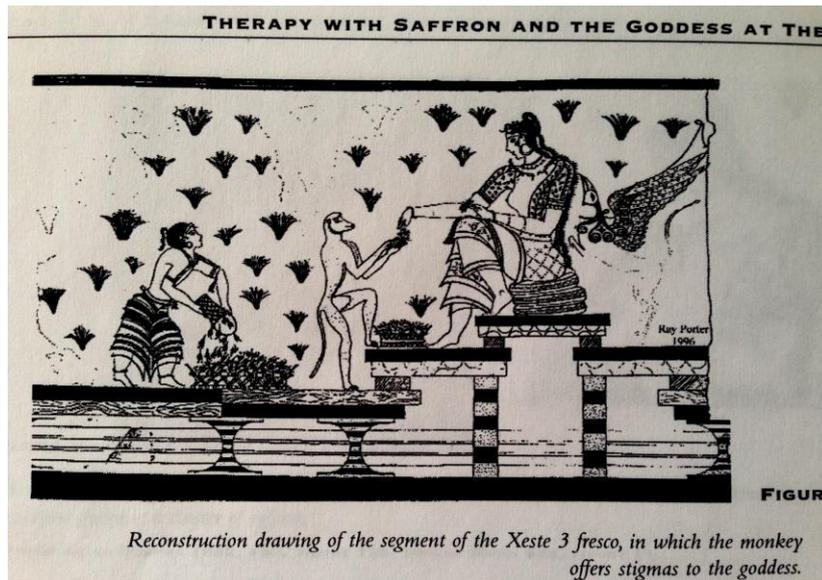


Figura 3. Ofrenda de estigmas a la diosa, tomada de Ferrence y Bendersky (2004)

El azafrán ha estado incluido en las Farmacopeas Europeas desde el S XVI hasta el S XX, como parte de un gran número de fórmulas magistrales y en los Catálogos de Plantas Medicinales (Catálogos de Plantas Medicinales editados por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos) (Figura 4).

Su uso medicinal desapareció con el desarrollo de la química de síntesis y el empuje de la industria farmacéutica. En la actualidad está creciendo el interés científico por demostrar la bioactividad ya conocida del azafrán (Licón y col., 2010; Razak y col., 2017). Las propiedades bioactivas que les señalan las publicaciones científicas recientes son atribuidas a sus componentes principales: crocetina, sus ésteres glucosídicos, denominados crocinas, o al safranal, pero también a la sinergia de todos los compuestos presentes en la especia.

*Prepárense mil partes de tintura operando por doble maceración de cien partes de azafrán generalmente pulverizado en cantidad suficiente de alcohol de 70° y recomienda que se conserve en frascos con tapón esmerilado y resguardado de la luz.*

Figura 4. Formulación con azafrán recogida en la IX edición de la Farmacopea Española. Fuente Real Academia Nacional de Medicina (1954)

### 1.1.1.1. Compuestos responsables del color

Las sustancias responsables del intenso color que proporciona el azafrán a soluciones acuosas son carotenoides. El carotenoide mayoritario del azafrán fue aislado por primera vez por Aschoff en 1818, le llamó crocina, derivado de la palabra "crocós", que significa azafrán en alemán. Decker (1915) demostró su naturaleza glucosídica y Karrer y Salomon (1928 y 1930) establecieron su estructura y fórmula molecular. El nombre según la IUPAC es Bis[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-({[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il]oxi}metil)tetrahydro-2H-piran-2-il] (2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E)-2,6,11,15-tetrametil-2,4,6,8,10,12,14-hex adecaheptaenedioato. También se ha nombrado como digentiobiosyl 8,8'-diapo-carotene-8,8'-dioate (IUPAC, 1974).

La crocetina (Figura 5) es el carotenoide dicarboxílico que al glicosilarse recibe el nombre de crocina. Las crocinas presentes en los extractos acuosos de azafrán son un pool de las mismas y a altas concentraciones sufren un fenómeno de agregación.

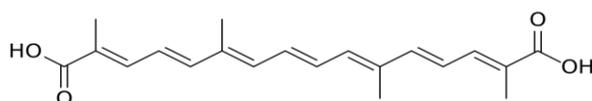


Figura 5. Estructura de la crocetina

En 1982 Pfander aisla 6 y Speranza en 1984 identifica sus isómeros *cis* y *trans* con cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y espectrofotometría UV-visible (UV-V). Tarantilis en 1995 identifica un gran número de crocinas y en 2006, Carmona y col. reconocen 4 más y aportaron una forma simplificada de nombrar los ésteres glucosídicos del carotenoide crocetina (Tabla 2): T-5 tG (*trans*-crocetin ( $\beta$ -D-triglycosyl)-( $\beta$ -D-gentiobiosyl) ester), T-5 nG (*trans*-crocetin ( $\beta$ -D-neopolitanosyl)-( $\beta$ -D-gentiobiosyl) ester), T-4GG (*trans*-crocetindi-( $\beta$ -D-gentiobiosyl) ester), T-3Gg (*trans*-crocetin ( $\beta$ -D-glycosyl)-( $\beta$ -D-gentibiosyl) ester), T-2G (*trans*-crocetin ( $\beta$ -D-gentiobiosyl)ester), C-4GG (*cis*-crocetin di-( $\beta$ -D-gentiobiosyl) ester) y C-3Gg(*cis*-crocetin ( $\beta$ -D-glycosyl)-( $\beta$ -D-gentiobioyl) ester), T-4

ng (*trans*-crocetin( $\beta$ -D-neopolitanosyl)-( $\beta$ -D-glycosyl) ester), T-2gg (*trans*-crocetin di-( $\beta$ -D-glycosyl) ester), T-1g (*trans*-crocetin ( $\beta$ -D-glycosyl) ester), C-4 ng (*cis*-crocetin ( $\beta$ -D-neopolitanosyl)-( $\beta$ -D-glycosyl) ester), C-1g (*cis*-crocetin ( $\beta$ -D-glycosyl) ester) y C-2G (*cis*-crocetin ( $\beta$ -D-gentiobiosyl) ester).

Desde que se despertó el interés por conocer objetivamente la calidad del azafrán se desarrollaron numerosos métodos de extracción y análisis para separar, identificar y cuantificar los ésteres glucosídicos de crocetina, en adelante nombrados como crocinas. El método desarrollado por Corradi y Micheli (1979) se basa en medidas de absorbancia a 440 nm por espectrofotometría UV-vis de un extracto acuoso de azafrán, pues alrededor de esta longitud de onda las crocinas presentan un máximo de absorción y se determina el total de estos carotenoides y el poder colorante.

Tabla 2. Estructura de los esteres de crocetina (crocinas) encontrados en el azafrán, tomada de Carmona y col., 2006

Crocins structure			
Nº glucose moieties (R + R')	Moiety distribution (R/R')	Isomer	Named as
5	triglucoside / gentiobioside	<i>trans</i>	<i>trans</i> -5-tG
		<i>cis</i>	<i>cis</i> -5-tG
	neapolitanoside / gentiobioside	<i>trans</i>	<i>trans</i> -5-nG
		<i>cis</i>	<i>cis</i> -5-nG
4	neapolitanoside / glucoside	<i>trans</i>	<i>trans</i> -4-ng
		<i>cis</i>	<i>cis</i> -4-ng
	gentiobioside / gentiobioside	<i>trans</i>	<i>trans</i> -4-GG
		<i>cis</i>	<i>cis</i> -4-GG
3	gentiobioside / glucoside	<i>trans</i>	<i>trans</i> -3-Gg
		<i>cis</i>	<i>cis</i> -3-Gg
2	gentiobiose / hydrogen	<i>trans</i>	<i>trans</i> -2-G
		<i>cis</i>	<i>cis</i> -2-G
	glucose / glucose	<i>trans</i>	<i>trans</i> -2-gg
		<i>cis</i>	<i>cis</i> -2-gg
1	glucose	<i>trans</i>	<i>trans</i> -1-g
		<i>cis</i>	<i>cis</i> -1-g

Pero para poder separar, identificar y cuantificar cada una de las distintas crocinas se desarrollaron métodos basados en cromatografía líquida de alta resolución con detector UV-vis (HPLC-UV-vis) (Pfander y Wittwer, 1975; Speranza y col., 1984); en cromatografía de capa fina (TLC) (Sujata y col., 1992), y en HPLC con detectores de diodos alineados y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS) (Tarantilis, 1995; Carmona y col., 2006a) que permitieron la separación e identificación de las distintas crocinas presentes en el azafrán. Hasta hace poco tiempo su cuantificación ha sido bastante compleja debido a la no disponibilidad de patrones comerciales (Sánchez y col., 2008a) y al fenómeno de auto-agregación molecular que ocurre en sus diluciones acuosas concentradas. En la actualidad pueden ser determinados pues existen estándares comerciales de alta pureza, en su forma *trans*, las crocinas, *trans*-4-GG y *trans*-3-Gg (García-Rodríguez y col., 2014).

El contenido de crocinas en la especia varía según la calidad, pero los azafranes pueden llegar a alcanzar porcentajes muy elevados, entre 25 y 35% en masa de azafrán deshidratado (García-Rodríguez y col., 2014). Esta alta concentración de carotenoides, y por tanto de una posible alta capacidad antioxidante, puede ser la responsable de las propiedades bioactivas del azafrán.

#### **1.1.1.2. Compuestos responsables del sabor amargo**

La picrocrocina ( $C_{16}H_{26}O_7$ ) [4-( $\beta$ -D-glucopiranosiloxi)-2,6,6-trimetil-1ciclohexeno-1-carboxaldehido] es la sustancia responsable del sabor amargo del azafrán. Su presencia en el azafrán es importante, alrededor de un 26% de la materia seca, dependiendo del proceso de deshidratación y del envejecimiento de la especia (Sánchez y col., 2008b).

La estructura de la picrocrocina la establecieron Khun y Winterstein en 1934 (*Figura 6*).

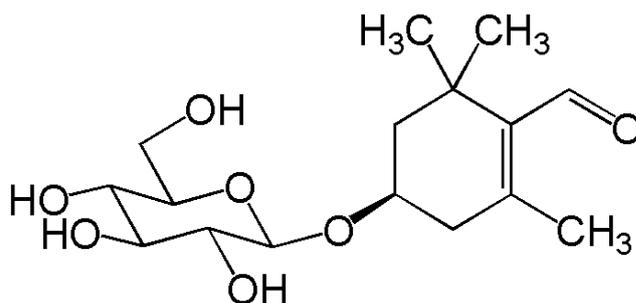


Figura 6. Estructura de la picrocrocina

La picrocrocina es el precursor del safranal, sólo se ha identificado en el género *Crocus*, cuya única especie comestible es el *Crocus sativus* L. En 2011 se determinó la cinética de degradación de la picrocrocina en un extracto acuoso de azafrán sometido a un tratamiento térmico desde 5°C a los 70°C (Sánchez y col., 2011) siendo la picrocrocina más estable que las crocinas.

### 1.1.1.3. Compuestos responsables del aroma

Se han identificado más de 40 compuestos relacionados con el aroma del azafrán, siendo el compuesto mayoritario el safranal (2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadieno-1-carboxaldehído) (Figura 7)(Carmona y col., 2007). En el azafrán de más alta calidad en el mundo, “Azafrán de La Mancha”, el safranal representa alrededor del 65% del total del aroma (Official Journal of European Communities).

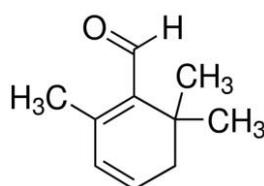


Figura 7. Estructura del safranal

Durante el proceso de deshidratación, manipulación y almacenaje del azafrán se genera el safranal (Figura 7), por hidrólisis y deshidratación de la picrocrocina (Figura 8) (Himeno y Sano, 1987). Se determina de acuerdo con la norma ISO 3236 (2011) midiendo la absorbancia a 330 nm de un extracto acuoso de azafrán. Sin embargo, esta técnica no es buena porque a la longitud de onda

mencionada también absorben los isómeros *cis* derivados de la crocetina (García-Rodríguez y col., 2017) y se producen interferencias en la medida, el safranal aporta menos del 2% a la absorbancia a 330 nm de este extracto acuoso. Otros métodos utilizados son la cromatografía líquida de alta definición (HPLC) (García-Rodríguez y col., 2014), para la cuantificación pormenorizada de las crocinas, picrocrocina y safranal, usando una solución de azafrán obtenida de acuerdo con la norma ISO 3632 y la cromatografía de gases (GC) para la determinación de los compuestos volátiles (Anastasaki y col., 2009). La solubilidad en agua del safranal a 20°C ( $\pm 2$ ) es de 637,07 mg/l (García-Rodríguez y col., 2014).

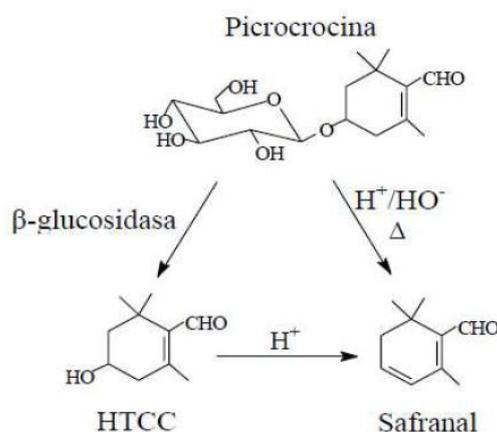


Figura 8. Generación del safranal (Himeno y Sano, 1987)

### 1.1.2. Farmacocinética del azafrán: bioaccesibilidad y biodisponibilidad

La bioaccesibilidad de un compuesto químico de un alimento se puede definir como la cantidad o fracción del mismo que se libera de la matriz del alimento en el tracto gastrointestinal y se convierte en disponible para la absorción (Saura-Calixto y col., 2000; Heaney, 2001). El concepto incluye la digestibilidad y la asimilación. La digestibilidad es la fracción de componentes potencialmente asimilables e incluye los procesos físico-químicos que tiene lugar en el lumen gastrointestinal. La asimilación es la etapa de captación del material bioaccesible por el epitelio mediante mecanismos de absorción transepitelial. Generalmente la bioaccesibilidad se determina por procedimientos de digestión *in vitro*.

El concepto de biodisponibilidad hace referencia a la proporción de un nutriente contenido en un alimento que es absorbido para su utilización y almacenamiento por el organismo (Granado y col., 2006). Muchos autores dan por implícito en el término biodisponibilidad el de bioactividad, y responde a la lógica, pues el primero es un término acuñado en el campo farmacológico para medir actividades de los principios activos. El término biodisponibilidad engloba la bioactividad (cuando el nutriente llega al tejido diana y se produce la respuesta fisiológica). En general, la biodisponibilidad incluye la digestión gastrointestinal, absorción, metabolismo, distribución tisular y bioactividad (*Figura 9*).

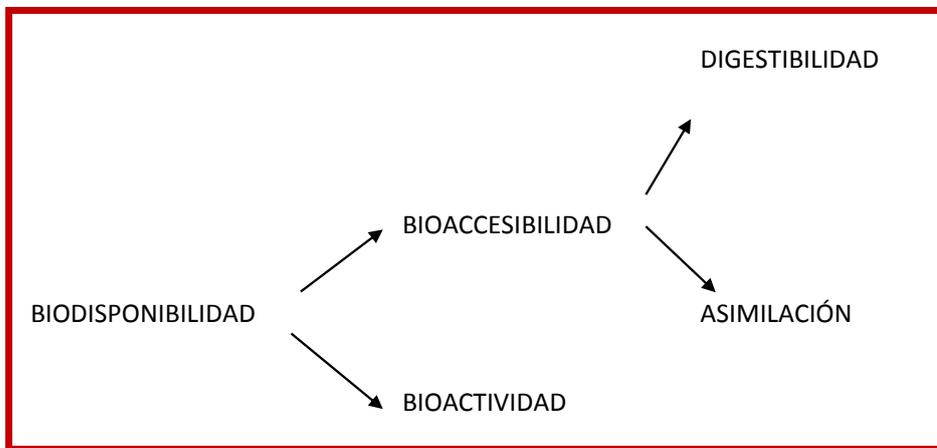


Figura 9. Esquema de la biodisponibilidad

El azafrán es fuente de carotenoides, pigmentos naturales con una estructura química característica de sistema de dobles enlaces conjugados, responsables del color, reactividad y procesos de transferencia de energía (Britton, 1995a).

La farmacocinética de los carotenoides más extendidos en la naturaleza es conocida. Estos, tras liberarse de su matriz alimentaria, se absorben por la mucosa intestinal mediante difusión pasiva, siendo incorporados a los quilomicrones sin ser modificados y posteriormente son secretados al torrente sanguíneo (Erdman y col., 1993; Parker, 1996).

Los carotenoides mayoritarios del azafrán presentan la peculiaridad de su hidrosolubilidad debido a que son ésteres glucosídicos. Aunque son muchos los estudios que demuestran sus diversas actividades biológicas en humanos, la forma de administración, absorción y metabolismo de estos carotenoides está aún por resolver (Chryssanthi y col., 2011).

Desde el punto de vista farmacocinético se asume que las crocinas no se absorben tras su administración oral, sino que se hidrolizan de forma importante a crocetina en el tracto intestinal (Xi y col., 2007). Los primeros datos sobre la bioaccesibilidad de las crocinas y la picrocrocina procedentes de un extracto acuoso de azafrán fueron presentados por Kyriakoudi y col. (2013), indicando que aproximadamente el 50% y el 70%, respectivamente eran bioaccesibles en condiciones de digestión gastrointestinal *in vitro*. Un estudio posterior señaló que a pesar de esta alta biodisponibilidad las cantidades transportadas (0,5 y 0,2%, respectivamente) son 10 veces menores que las de crocetina (Kyriakoudi y col., 2015). La bioaccesibilidad de las crocinas glicosiladas del extracto de azafrán (crocetina libre) fue investigada por Lautenschläger y col. (2015). Estudios *in vitro* han demostrado que las crocinas procedentes del azafrán probablemente no están biodisponibles en el compartimiento sistémico después de la aplicación oral porque se hidrolizan rápidamente, principalmente por enzimas del epitelio intestinal y en menor medida por la microbiota intestinal, a *trans*-crocetina desglucosilada, que es absorbida por difusión pasiva a través de la barrera intestinal (Lautenschläger y col., 2015).

La administración oral de crocinas consigue una concentración 56-81 veces mayor de crocetina en suero de rata que la administración oral de crocetina, lo que es interesante habida cuenta que el efecto farmacológico se le atribuye a la crocetina (Zhang y col., 2017).

La *trans*-crocetina es el único metabolito activo que se ha demostrado capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y llegar al sistema nervioso central (SNC) cuando se administra crocetina pura o un extracto de azafrán. Yoshino y col.

(2011) demostraron que esto ocurre 90 minutos después de la administración oral de crocetina pura a ratas. De forma similar, en 2013 Linardaki y col. probaron que después de la administración de extracto de azafrán a ratones, la crocetina llega al cerebro, y por tanto atraviesa la BHE (Figura 10).

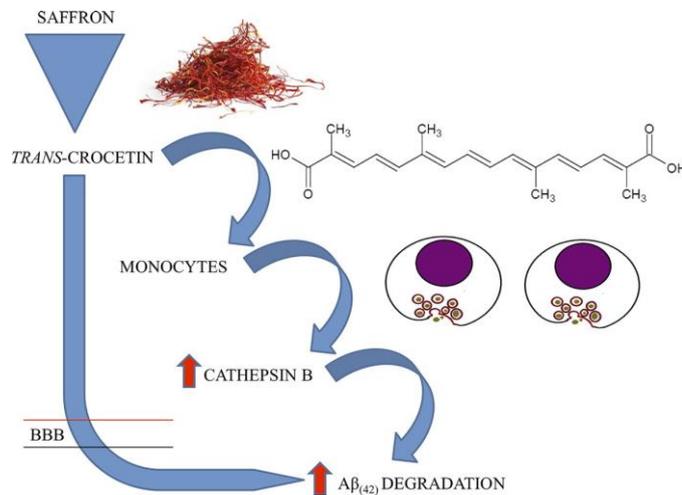


Figura 10. Paso de la crocetina a través de la barrera hematoencefálica (Linardaki y col., 2013)

La farmacocinética de la *trans*-crocetina ha sido validada en modelos animales (Asai y col., 2005; Zheng y col., 2005; He y col., 2014) y en plasma de voluntarios sanos (Umigai y col., 2011). Hay métodos para determinar de forma rápida y sensible la crocetina en el suero humano como el propuesto por Mohamadpour y col. (2013), útiles para futuros estudios farmacocinéticos clínicos. A diferencia de otros carotenoides, la crocetina se absorbe mucho más rápidamente detectándose en el plasma a la hora de ser administrada, alcanzando un máximo alrededor de las 4 h. Los estudios farmacocinéticos realizados en otros carotenoides C40, tales como caroteno, luteína y licopeno, ponen de manifiesto que tras la administración oral necesitan más tiempo para alcanzar las concentraciones máximas (Umigai y col., 2011). Estas diferencias se podrían explicar porque la crocetina es más hidrófila y de menor tamaño que los otros carotenoides (C20).

Asai y col. (2005), basándose en un estudio realizado en ratas, explican un modelo de ruta metabólica para la *trans*-crocetina y crocinas (Figura 11)

proponiendo que tras su administración oral las crocinas son hidrolizadas a *trans* y *cis*-crocetina, incorporándose así a la circulación sanguínea. Posteriormente la *trans*-crocetina puede ser parcialmente conjugada con mono y diglucuronidos, en el lumen intestinal, mucosa intestinal y en hígado, al que llega por vía porta sufriendo circulación enterohepática.

Kanakis y col. (2007) estudiaron en humanos la interacción de la crocetina con la albúmina del suero y demostraron que la interacción proteína-ligando es una unión débil, y por esta razón la crocetina tiende a distribuirse fácilmente a los tejidos del cuerpo.

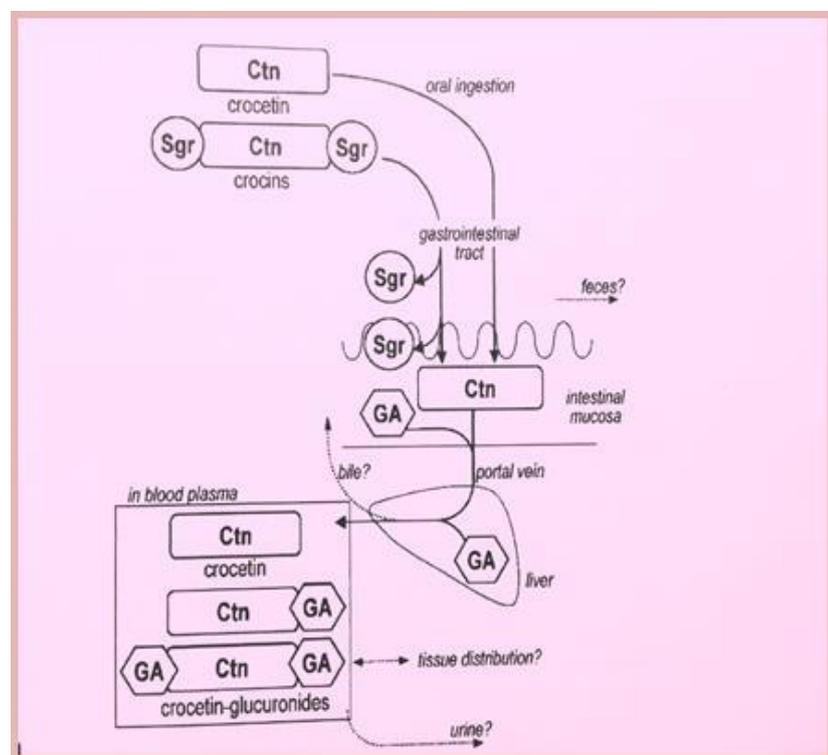


Figura 11. Propuesta de ruta metabólica tras la administración oral de crocetina y crocinas a ratones. Ctn, crocetina; GA, ácido glucurónico; y Sgr, azúcar (gentiobiosa o glucosa). (Asai y col., 2005)

Se evidenció además que la farmacocinética de la crocetina era proporcional a la dosis (Umigai y col., 2011). La rápida absorción de crocetina podría relacionarse con sus actividades farmacológicas. Por ello se precisan nuevos

estudios para comprender el comportamiento fisiológico de estos compuestos después de la ingestión oral, así como su absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). Además, el estudio de su metabolismo y biodisponibilidad es fundamental para determinar el perfil farmacológico y toxicológico de estos compuestos.

En los estudios realizados sobre la biodisponibilidad del azafrán, éste se administra bien directamente como especia completa, por extracción de algunos de sus metabolitos o por la síntesis química de ellos.

Aunque existen estudios sobre la farmacocinética de crocinas administradas por vía oral, no hay estudios que determinan la farmacocinética de azafrán especia. Se observa en la mayoría las publicaciones que estudian la bioactividad del azafrán una falta de caracterización de la muestra de partida, siendo por tanto desconocido el contenido de sus metabolitos principales. También se aprecian carencias en los métodos de preparación de las distintas formas de administración del azafrán, así como de la obtención de los principios activos, cuestión de gran importancia pues, muy probablemente, afecte a la concentración y absorción de sus metabolitos activos.

Son necesarios más estudios que determinen la farmacocinética del azafrán y de las crocinas partiendo de una buena caracterización.

### **1.1.3. Bioactividad del azafrán**

La consideración de una terapia preventiva en las enfermedades neurodegenerativas con el uso de especias se basa en evidencias encontradas en los últimos 10 años acerca del consumo de nutraceuticos derivados de las mismas (Kannappan, 2011; Ginwala, 2016). Hay un creciente interés en el uso de dietas especiales que incluyan hierbas culinarias y especias que ayuden al tratamiento de distintas enfermedades. Desde hace mucho tiempo es conocido el carácter antioxidante y antiinflamatorio de algunas especias, investigaciones recientes sugieren que los terpenos, entre otros compuestos, poseen propiedades

antioxidantes y podrían proteger frente a enfermedades crónicas, aunque los compuestos activos no han sido bien caracterizados en algunas especies. Es evidente que, la incidencia de ciertas enfermedades neurodegenerativas en el subcontinente asiático, donde la gente consume gran cantidad de especias, es mucho menor que en el mundo occidental (Bi y col., 2017). Esto nos hace pensar que el consumo de especias puede ayudar a frenar la proliferación de estas enfermedades.

El potencial efecto del azafrán dependerá de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad. Aunque las cantidades de consumo de azafrán varían considerablemente entre diferentes regiones y tipos de dietas culinarias, normalmente se utiliza en pequeñas cantidades para dar color, sabor y aroma a los alimentos, formando parte integral del mismo. La especia contiene altas concentraciones de compuestos bioactivos que pueden contribuir a sus efectos beneficiosos. Debe estudiarse la biodisponibilidad de las especias con estudios epidemiológicos para poder confirmar los efectos beneficiosos de su ingesta (Bi y col., 2017).

#### ***1.1.3.1. Bioactividad de la crocetina y las crocinas***

Tradicionalmente el azafrán, sus extractos y tinturas, han sido empleados en el tratamiento de diversos tipos de enfermedades sin efectos secundarios tóxicos. Alguna de sus aplicaciones ha sido como: antiespasmódico, eupéptico, sedante, carminativo, diaforético, expectorante, estomacal, estimulante, afrodisíaco, emenagogo y abortivo. Muy extendido fue su uso en el tratamiento de enfermedades genitales, regulación y alivio de la menstruación. Su acción abortiva era bien conocida en la Edad Media, aplicándose además por las matronas en partos por su acción sedante y antiespasmódica (Carmona y col., 2006a). También ha sido empleado para tratar afecciones oculares, curar heridas, fracturas y dolores articulares y otras muchas más aplicaciones, que hicieron que Plinio “El Viejo” lo describiera como una especie de panacea en su obra *Naturae Historiarum* XXXVII libro (Alonso y col., 1998). Hosseinzadeh y Nassiri-Asl (2013) describen los usos farmacológicos del azafrán recogidos en el Canon de Avicena

relacionándolos con los numerosos estudios científicos recientes, lo que refleja un gran interés en las posibles aplicaciones biomédicas de esta especie.

Desde hace varias décadas se está estudiando el posible papel beneficioso del azafrán o de sus crocinas en la prevención y desarrollo de diversas enfermedades crónicas. Los resultados obtenidos, concordantes con los antiguamente conocidos, han permitido avanzar en la investigación e iniciar estudios de intervención con carotenoides componentes de la dieta, identificados como responsables de los efectos beneficiosos (Olmedilla y Granado, 2000). La alta capacidad antioxidante justifica la mayoría de las propiedades preventivas o curativas en enfermedades crónicas y degenerativas (Escribano y col., 1996; Hausenblas y col., 2013; Alavizadeh y col., 2014).

En la última década numerosos estudios científicos resaltan las propiedades biomédicas y farmacológicas del azafrán o de alguno de sus metabolitos (Licón y col., 2010; Ulbricht y col., 2011; Bolhassani y col., 2014; Bagur y col., 2017b). Se han demostrado los efectos beneficiosos de las crocinas sobre muchos órganos: gastrointestinal, cardiovascular, endocrino, genital, sistema inmune, etc., siendo el SNC el más estudiado (Alavizadeh y col., 2014). Si bien muchos de estos estudios fundamentan estos efectos en el carácter antioxidante de los carotenoides del azafrán, los mecanismos de acción no están suficientemente estudiados.

#### ***1.1.3.2. Bioactividad de la picrocrocina y del safranal***

La bioactividad atribuida al safranal presenta gran variabilidad y es menos conocida que la de las crocinas (Kyriakoudi y col., 2015). Hay estudios que atribuyen efectos específicos al safranal, especialmente efecto antidepresivo y saciante (Gout y col., 2010) y efecto anticonvulsivante, frente a las crocinas que no lo mostraron (Hosseinzadeh y Talebzadeh, 2005; Hosseinzadeh y Sadeghnia, 2007). La picrocrocina presenta actividad antiproliferativa en línea de células de cáncer humano (Kyriakoudi y col., 2015). El safranal combate el estrés oxidativo en

las neuronas, debido a su acción antioxidante eliminando los radicales libres (Kanakis y col., 2007).

Algunos autores atribuyen la acción antioxidante indistintamente a cualquiera de los componentes del azafrán (Assimopoulou y col., 2005; Mashmoul y col., 2013; Farahmand y col., 2013). Otros señalan que el safranal no tiene acción sobre determinados efectos como la actividad sexual, atribuyéndolos al extracto acuoso del azafrán y las crocinas (Hosseinzadeh y col., 2008).

#### **1.1.4. Azafrán como fuente de productos antioxidantes**

Los compuestos fenólicos y los carotenoides, fuente principal de compuestos antioxidantes de la dieta, nos protegen frente al daño provocado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Moure y col., 2001). Las ROS son pequeñas moléculas altamente reactivas debido a la presencia de electrones no apareados o a su capacidad para dar lugar a nuevos radicales libres, capaces de iniciar la peroxidación de lípidos, inactivar proteínas, o causar daño molecular de ADN.

Existen muchas formas diferentes de ROS, como son el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), superóxido u oxígeno singlete ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), radical peróxido ( $LOO^{\bullet}$ ), y otros radicales libres. El superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) es convertido a  $H_2O_2$  por la superóxido dismutasa (SOD), sin embargo, en combinación con el óxido nítrico da lugar a peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ). Después el  $H_2O_2$  es desintoxicado por enzimas antioxidantes endógenas o, en presencia de metales de transición, convirtiéndose en radicales hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) (Figura 12).

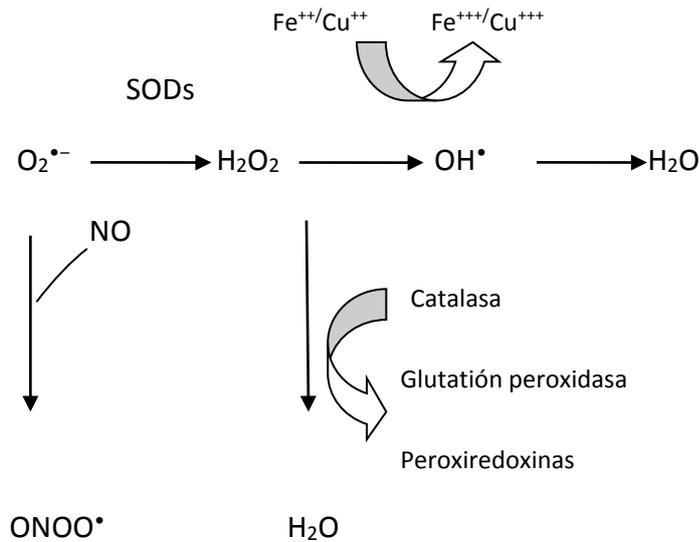


Figura 12. Esquema de la formación y desintoxicación de las especies reactivas de oxígeno

Concentraciones fisiológicas de ROS regulan diversos procesos biológicos, como por ejemplo, el control de la ventilación y la producción de eritropoyetina. Además, las ROS se producen en grandes cantidades por las células inmunes para eliminar los agentes patógenos y facilitar la fagocitosis. Sin embargo, cuando se generan en exceso o no son adecuadamente controladas, los ROS sobrepasan la capacidad antioxidante celular y dan lugar a daños celulares y lesiones en los tejidos (van Horssen y col., 2011), además, las células post mitóticas del SNC tienen muy baja capacidad para combatir el estrés oxidativo lo que provoca daños en ADN, proteínas y lípidos (Hardingham y Lipton, 2011). Se ha demostrado que los carotenoides inactivan oxígeno singlete, hidroxilo, peróxidos y otros oxidantes mediante un proceso en el que se transfiere la energía de altos niveles de excitación a un triplete del carotenoide. Esta molécula puede volver al estado basal liberando calor o modificando la molécula basal.

Hay numerosos estudios sobre carotenoides, fitoesteroles, compuestos fenólicos, polifenoles y compuestos sulfurados, que indican que puede ser beneficioso incluirlos en las dietas de personas con enfermedades neurodegenerativas, bien incrementado la ingesta de los alimentos que los contienen en mayor cantidad; tomando complementos alimenticios con estas

moléculas o alimentos reforzados con estos compuestos bioactivos (Lozano y col., 2016). Las ROS están implicadas en más de 100 enfermedades diferentes entre las que se encuentran distintos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y vasculares y desórdenes neurodegenerativos (Martínez Cayuela, 1995; Aldershvile y col., 1998). Se han encontrado relaciones inversas entre una dieta con alta capacidad antioxidante total y la adiposidad central, estrés oxidativo, bio-marcadores, y riesgo de enfermedades cardiovasculares (Vincent y col., 2007; Abete y col., 2011; Hermsdorff y col., 2011). En trastornos neurodegenerativos, incluyendo las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y la EM, la producción de ROS supera la capacidad antioxidante y contribuye a la lesión celular (Scannevin y col., 2012; Hardingham y col., 2011).

La protección antioxidante puede ser una posible diana terapéutica para la EM ya que las ROS juegan un papel fundamental en la fase inicial y en la fase crónica de la enfermedad. La EM progresa con ataques agudos con inflamación de la mielina. Numerosas evidencias indican que en las placas de EM hay una amplia lesión oxidativa y que el daño inducido por las ROS ocurre desde las primeras etapas de la neuroinflamación (González-González, 2015).

El punto de enlace entre el estrés oxidativo y el proceso autoinmune parece ser a través de la conexión con NO, molécula clave en la función inmunológica y en la generación de ONOO\*, que junto con las ROS favorecen el proceso desmielinizante a través de la lipoperoxidación (Flores-Alvarado y col., 2015). Estudios en animales han demostrado que la ingesta de antioxidantes exógenos, incluyendo flavonoides y ácido  $\alpha$ -lipoico, pueden reducir la progresión y signos clínicos de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), pero los datos en pacientes son todavía muy limitados (González-González, 2015). Hay tratamientos concomitantes con el uso de antioxidantes que prometen ser eficaces en la disminución del estrés oxidativo en la EM (Flores-Alvarado y col., 2015).

Nam y col. (2010) sugieren un efecto neuroprotector de las crocinas y crocetina por su acción antiinflamatoria en células microgliales, ensayadas en

cerebro de rata, con disminución de moléculas neurotóxicas como TNF- $\alpha$ , interleuquina-1 $\beta$  y ROS intracelulares. La restauración del balance redox en los tejidos cerebrales puede ser una buena estrategia terapéutica para limitar la neuroinflamación y consecuentemente el daño oxidativo tisular (van Horsen y col., 2011).

El azafrán y sus constituyentes, crocinas y safranal, han mostrado ser potentes eliminadores de las ROS, explicándose así algunos de los efectos saludables de la especia (Assimopoulou y col., 2005; Kanakis y col., 2007, 2009; Karimi y col., 2010; Mashmoul y col., 2013; Farahmand y col., 2013).

El avance en los estudios de la polarización de la microglía a los estados M1 (pro-inflamatorio) y M2 (neuroprotector), sugiere que los compuestos bioactivos, presentes en los alimentos y/o compuestos de síntesis pueden influir en la activación de la microglía contribuyendo a la supervivencia neuronal y mejora de la función cognitiva durante el envejecimiento (*Figura 13*) (Peña-Altamira y col., 2017).

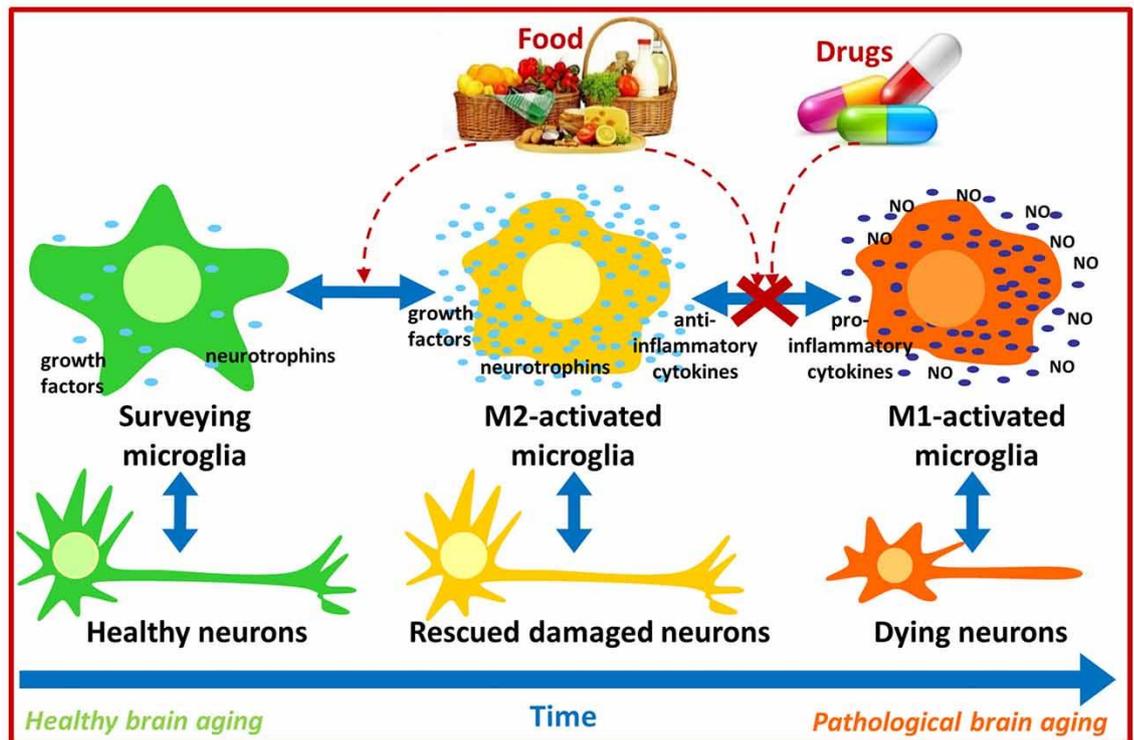


Figura 13. Posibles enfoques farmacológicos y nutricionales con influencia inmunomodulatoria en el estado de activación microglial durante el envejecimiento o deterioro neuronal (Peña-Altamira y col., 2017)

Las dietas ricas en carotenoides naturales, como la astaxantina y la crocetina, presentes respectivamente en animales marinos y el azafrán, se asocian a un menor riesgo de padecer algunas enfermedades neurológicas y a un efecto anti-obesidad. Niveles bajos de carotenoides en sangre se han asociado con factores de riesgo de síndrome metabólico (elevado índice de resistencia a la insulina, insulinemia en ayunas, LDL oxidadas, hemoglobina glicosilada y niveles circulantes de marcadores inflamatorios como la proteína-C reactiva). Diversos estudios epidemiológicos en humanos asocian ingestas dietéticas y niveles séricos de carotenoides elevados con adiposidad reducida. En personas obesas se ha evidenciado una escasa ingesta y estatus de carotenoides (Bonet y col., 2017).

En la EM, el estrés oxidativo contribuye a la migración leucocitaria que da lugar al deterioro de los oligodendrocitos y al daño neuronal, las ROS y nitrógeno generado en el SNC de estos pacientes a partir de macrófagos y microglías activados es responsable de la desmielinización (Miller y col., 2013). Las dietas ricas en antioxidantes disminuyen la neuroinflamación y protegen las neuronas.

Determinados alimentos (verduras, frutas, té, soja), tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante, que podría estar relacionada con la prevención de la desmielinización y con disminución de la actividad de la enfermedad (Vauzour, 2012).

La eficacia en estudios preclínicos, *in vitro* e *in vivo*, contrasta con los escasos resultados en ensayos clínicos. La razón pudiera estar en la necesidad de ajustar las concentraciones y tiempos. Se precisa investigar en esta línea ya que los agentes terapéuticos deben atravesar la BHE para poder actuar en las enfermedades neurológicas (Carvalho y col., 2016).

#### **1.1.5. Actividad del azafrán sobre el Sistema Nervioso Central y Sistema Nervioso Periférico**

Se atribuye al azafrán y sus metabolitos efectos farmacológicos sobre el SNC, con acción biológica sobre la memoria y el aprendizaje, enfermedades neurodegenerativas, depresión y ansiedad, entre otros muchos efectos.

Alavizadeh y col. (2014) nos acercan a la comprensión de las propiedades biológicas de las crocinas. Los estudios de Sugiura y col. (1994, 1995); Abe y col. (1999); Ahmad y col. (2005); Zheng y col. (2007); Hosseinzadeh y col. (2008a); y Ghazavi y col. (2009), son ejemplos de la profusión de literatura que avala la actividad biológica de estas moléculas.

Entre los numerosos efectos demostrados sobre el SNC destacamos los siguientes:

##### **1.1.5.1. Memoria y aprendizaje**

Los desórdenes neurodegenerativos a menudo van asociados a alteraciones de la memoria y aprendizaje (Alavizadeh y Hosseinzadeh, 2014). Muchas personas con EM experimentan disminución de la memoria, aunque no se han identificado los factores de riesgo (Leavitt y col., 2017).

Abe y col. (1998) atribuyeron a las crocinas acción antagónica a la potenciación inducida por el etanol en las neuronas del hipocampo. Además, sugirieron un posible mecanismo de acción sobre los receptores del N-metil-D-aspartato (NMDA), que son receptores del neurotransmisor glutamato, con acción en la plasticidad neuronal y memoria. Así mismo, estudiando los efectos protectores de un extracto de azafrán y sus crocinas, concluyeron, que podrían prevenir el deterioro del aprendizaje y la memoria, así como el daño por estrés oxidativo en el hipocampo inducido por el estrés crónico.

Otras publicaciones llevadas a cabo por Abe y Saito (2000) y Sugiura y col. (1995) ponen de manifiesto la acción de extractos de azafrán o sus constituyentes activos, sobre la mejoría en la memoria y habilidades de aprendizaje.

Estudios *in vivo* demuestran que también tienen acción positiva en déficits de aprendizaje y están implicados en los mecanismos subyacentes de reconocimiento y memoria espacial (Pitsikas y col., 2007; Pitsikas y Tarantilis, 2017).

El tratamiento con extracto de azafrán durante 7 días consecutivos, en un estudio realizado en ratas en un modelo experimental de EM, mejoró el deterioro del aprendizaje y la memoria ( $p < 0,05$ ) y las alteraciones de los parámetros de estrés oxidativo en el hipocampo ( $p < 0,01$ ) (Ghaffari y col., 2015).

Algunos estudios reflejan que los extractos acuosos de *C. sativus*, reducen los signos del síndrome de abstinencia de la morfina en ratones, sugiriendo un efecto inhibitor de la dependencia de morfina (Hosseinzadeh y Jahanian, 2010). Así mismo, los extractos etanólicos y acuosos de *C. sativus* y safranal, atenúan los síntomas conductuales relacionados con el dolor neuropático (Amin y Hosseinzadeh, 2012). Otros estudios manifiestan mejoría en las alteraciones de la memoria y aprendizaje inducido por la morfina (CPP), que es un modelo conductual para medir los efectos neurofarmacológicos de las drogas de abuso,

con extractos acuosos de *C. sativus* en ratones (Mojabi y col., 2008; Imenshahidi y col., 2010; Naghibi et al., 2012).

#### **1.1.5.2. Alzheimer**

El Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes asociadas a la edad y conlleva un importante deterioro de la función cognitiva. Se caracteriza por la formación de placas cerebrales cargadas con el polipéptido  $\beta$ -amiloide así como de prominentes ovillos neurofibrilares de la proteína tau.

Estudios in vitro han demostrado que un extracto hidroalcohólico de azafrán (50:50 v/v) y crocinas a diferentes dosis, son capaces de inhibir la fibrillogénesis de amiloide  $\beta$ -péptido. Otros mecanismos también implicados en la acción anti-Alzheimer del azafrán son el efecto inhibitor en la actividad de la acetilcolinesterasa. También hay hallazgos clínicos que han puesto de relieve la eficacia en la enfermedad de Alzheimer de leve a moderada. Aunque son necesarios más ensayos clínicos en humanos, algunos estudios han puesto de manifiesto el carácter neuroprotector del azafrán y sus componentes, con efectos semejantes de los obtenidos con el donepezil y nemantina en pacientes de Alzheimer (Akhondzadeh y col., 2010a, 2010b; Alavizadeh y Hosseinzadeh, 2014; Farokhnia y col., 2014).

#### **1.1.5.3. Parkinson**

Además de tener potencialidad terapéutica, se ha demostrado que la crocetina podría ser útil en la disminución del riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson. En un estudio realizado por Ahmad y col. (2005) en ratas hemiparkinsonianas, se comprobó que protegía los niveles de ácido tiobarbiturico, sustancia reactiva en la sustancia negra. Purushothuman y col. (2013) estudiaron el efecto de un extracto de azafrán (0,01% m/v) sobre las células dopaminérgicas en un modelo de ratones con Parkinson inducido, concluyendo que el pretratamiento con azafrán protege muchas de las células de la sustancia negra pars compacta.

#### **1.1.5.4. Isquemia cerebral**

La actividad neuroprotectora del azafrán ha sido demostrada en modelos experimentales de isquemia cerebral. Los biocompuestos del azafrán son capaces de atenuar las alteraciones inducidas por la isquemia, probablemente debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas, presentando efecto cardioprotector. El estudio de Wang y col. (2014) administró 50 mg/kg/día de crocetina a una población de ratas, demostrando que reduce el daño cardíaco, el estrés oxidativo y la inflamación. Asimismo, se apreció decrecimiento en los niveles de tamaño del infarto. Estas acciones ya se habían puesto de manifiesto en estudios anteriores como los de Hosseinzadeh y Sadeghnia (2007), que afirmaba reducción del daño oxidativo en isquemia cerebral, o los de Zheng y col. (2007) que observaron reducción del daño oxidativo en los microvasos cerebrales.

Numerosos estudios afirman que la crocetina aumenta la difusión de oxígeno y por tanto la oxigenación de diversos tejidos (Gainer y Nugent, 1976; Seyde y col., 1986; Holloway y Gainer, 1988; Gainer y col., 2005; Gainer, 2008). En 2011, Yang y col. demostraron que la crocetina, administrada a animales de experimentación tras shock hemorrágico, aumentaba significativamente la supervivencia y reducía la apoptosis.

El *trans*-sodio crocetinato (TSC) es un nuevo compuesto propuesto para el tratamiento de la isquemia tras el shock hemorrágico, por haber demostrado que aumenta la oxigenación de los tejidos y la supervivencia, estudiándose su posible aplicación para disminuir el daño producido por la isquemia/hipoxia de los trastornos neurológicos (Giassi, 2002). El uso de modelos moleculares simulados en ordenador sugirieron que las interacciones entre la parte hidrofóbica de la molécula de TSC y el agua mejoraban el paso de oxígeno de los alvéolos a los eritrocitos. Mediciones in vitro confirman un aumento del 30% en la tasa de difusión de oxígeno entre los eritrocitos y los tejidos, mediante la alteración de la "estructura" del agua en el plasma sanguíneo (Singer, 2000; Gainer, 2008).

Se está desarrollando un ensayo clínico con TSC, ahora en fase III, de investigación por Diffusion Pharmaceuticals LLC., como coadyuvante en tratamientos de radioterapia y quimioterapia en tumores sólidos resistentes como el glioblastoma (*Figura 14*). La hipoxia en este tipo de tumores, es el resultado de su rápido crecimiento. Las células tumorales cancerosas prosperan en hipoxia, ya que los cambios resultantes en el microambiente del tumor confieren resistencia al tratamiento de radiación y quimioterapia dentro de la célula cancerosa hipóxica. El TSC re-oxigena y promueve una mayor difusión de oxígeno a través del plasma sanguíneo que llega al tumor hipóxico (Gainer y col., 2017; Sheehan y col., 2017).

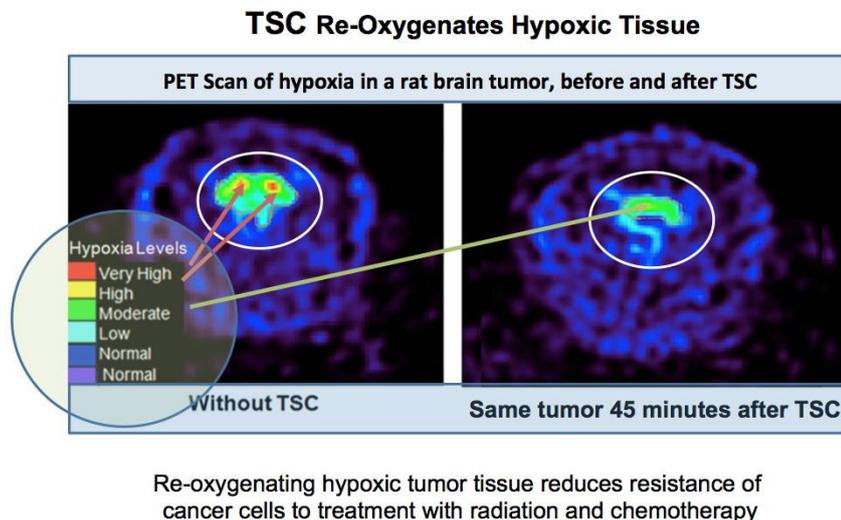


Figura 14. Reoxigenación con *trans*-sodio crocetinato (TSC). Imagen tomada de (<http://www.diffusionpharma.com>)

#### **1.1.5.5. Efecto antidepresivo y ansiolítico**

El azafrán y sus metabolitos han demostrado ser efectivos en diferentes modelos de trastornos psiquiátricos, incluidos la depresión y la ansiedad. Diversos estudios clínicos realizados respaldan la posible utilidad terapéutica de que la administración diaria de 30 mg de azafrán da resultados beneficiosos en el tratamiento de la depresión, comparando sus efectos con la imipramina o fluoxetina (Akhondzadeh y col., 2004, 2005; Noorbala y col., 2005; Shahmansouri y col., 2014). Hay estudios que justifican el uso de azafrán como coadyuvante de algunos fármacos como imipramina o fluoxetina, obteniendo mejorías significativas respecto al grupo placebo (Talaie y col., 2015).

Un ensayo con 66 pacientes con trastorno depresivo mayor acompañado de ansiedad recibieron azafrán (30 mg/día) o citalopram (40 mg/día) durante 6 semanas. Los resultados valorados en la escala de Hamilton para la depresión (HAM-D) y la escala de Hamilton para la ansiedad (HAM-A) mostraron que no hay diferencias significativas entre el uso del azafrán y el fármaco, proponiendo el azafrán como un tratamiento potencialmente eficaz y tolerable para este trastorno (Ghajar y col., 2017).

Estudios basados en el mecanismo de acción de las sustancias bioactivas del azafrán en la depresión, señalan que las crocinas pueden actuar a través de la inhibición de la absorción de los neurotransmisores dopamina y noradrenalina, y el safranal inhibiendo la recaptación de serotonina. Hay estudios in vivo que sugieren efectos inhibitorios sobre las monoamino-oxidasas (MAO-A y MAO-B), enzimas de degradación de los neurotransmisores anteriormente citados, provocando un aumento de los niveles de los mismos en el espacio sináptico y disminuyendo los síntomas depresivos de los pacientes (De Monte y col., 2014)

El efecto saciante de un extracto etanólico de azafrán (10% wt/v), disminuyendo la frecuencia del “picoteo”, fue estudiado por Gout y col., (2010), los cuales patentaron su producto. Además, Agha-Hosseini y col. (2008) investigando el tratamiento de los trastornos emocionales vinculados al síndrome premenstrual y encontraron que tomando azafrán (30 mg/día) se mejoraban estos síntomas.

#### **1.1.5.6. Diabetes neuropática**

Una de las complicaciones más severas de la diabetes mellitus, debida a los altos niveles de azúcar en sangre, es el daño neuronal causado por una disminución del flujo sanguíneo. Aproximadamente la mitad de los diabéticos desarrollan daño neurológico (Callaghan y col., 2012). El azafrán ha mostrado efectos protectores, presumiblemente debido a sus propiedades antioxidantes y transportador de oxígeno (Xi y col., 2007; Mousavi y col., 2010; Sheng, 2014).

### **1.1.5.7. Degeneración macular asociada a la edad**

Algunos estudios realizados con azafrán nos proporcionan datos importantes sobre acciones neuroprotectoras en la degeneración macular asociada a la edad (Falsini y col., 2010; Piccardi y col., 2012 y Bisti y col., 2014). Son estudios realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, los cuales ponen de manifiesto que la administración de crocetina tiene efectos protectores frente al daño de la retina, inhibiendo la degeneración del fotorreceptor y la disfunción retinal, sugiriendo que el mecanismo se basa en la inhibición del aumento de las caspasas 3 y 9 tras el daño retinal (Yamauchi y col., 2011).

### **1.1.5.8. Esclerosis múltiple**

En relación con la esclerosis múltiple (EM), Ghazavi y col. (2009) indicaron que el azafrán fue capaz de disminuir los síntomas de la enfermedad. Administraron un extracto etanólico de la especia, observando disminución de los síntomas clínicos y de infiltración de leucocitos en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Así mismo, Deslauriers y col. (2011) sugirieron que las crocinas podrían prevenir la desmielinización y la neurodegeneración. Estos resultados han sugerido que el azafrán puede ser potencialmente útil para el tratamiento de la EM por la inhibición del estrés oxidativo y la infiltración de leucocitos al SNC.

## **1.1.6. Actividad del azafrán sobre otras enfermedades**

### **1.1.6.1. Efecto antitumoral**

Numerosos estudios parecen indicar que la ingesta dietética de algunos carotenoides podría reducir el riesgo de desarrollar algunos cánceres. Este tipo de acción también ha sido atribuida al azafrán. Se ha observado en modelos de células cancerosas y en ratas, que el extracto acuoso de azafrán, inhibe la progresión de diferentes tipos de cáncer como: gástrico (Bathaie y col., 2013), colorectal (Shoshtari y col., 2012), pancreático (Bakshi y col., 2010) y de vejiga (Sun

y col., 2013), reduciendo el crecimiento celular e induciendo la apoptosis de las células cancerígenas (Li y col., 2012). Estudios recientes realizados en modelos *in vitro* e *in vivo* indican que los componentes del azafrán, particularmente, crocinas y crocetina, pueden tener efecto anticancerígeno en células de cáncer de mama, pulmón y páncreas (Samarghandian, 2014a). Estos constituyentes actúan deteniendo el ciclo celular en estadios tempranos o induciendo la apoptosis en etapas posteriores.

Hay que destacar que la mayoría de las investigaciones están dirigidas al estudio de la bioactividad de los metabolitos aislados del azafrán, siendo menor el número de trabajos que buscan propiedades anticancerígenas del azafrán en su forma natural.

El mecanismo de acción a día de hoy no está claro, pero su actividad podría estar relacionada con la acción antioxidante de las crocinas, que podría afectar a la regulación del crecimiento celular, modular la expresión génica y la respuesta inmune (Samarghandian y col., 2011). Diferentes estudios señalan su acción como activador de la apoptosis celular en células cancerígenas, no afectando a las normales (Escribano y col., 1996; Samarghandian y col., 2013; Bathaie, 2013; D'Alessandro, 2013).

En modelos animales y de cultivo celular, se atribuye a la crocetina la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos, mejorando la actividad del sistema antioxidante endógeno, induciendo la apoptosis y dañando las vías de señalización del factor de crecimiento del tumor (Guthleil y col., 2012).

En los distintos estudios con células cancerosas se observa gran variabilidad de resultados. Según Abdullaev (2002), estas diferencias pueden ser debidas a la existencia de distintos tipos de receptores celulares, al tipo de transporte intracelular, a diferencias en la cantidad de compuesto utilizado, a los distintos métodos de extracción o de determinación de las citotoxicidades. Algunos de los efectos obtenidos son los siguientes:

- En cáncer de piel en ratones, la administración oral de azafrán en ratones inhibe la formación de papilomas en la piel, y simultáneamente disminuye su tamaño (Das y col., 2010).
- Hay estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, con células tumorales de páncreas que indican que la crocetina y las crocinas podrían tener una potente acción antitumoral por la vía de la inhibición de la apoptosis (Dhar, 2009).
- Sobre cáncer de próstata se ensayaron extracto de azafrán (300 mg/kg), crocinas (200 mg/kg) y crocetina (100 mg/kg), observándose disminución del tamaño del tumor. En concreto, la crocetina, redujo la masa tumoral entre un 75-85% (Festuccia y col., 2014).
- En líneas de células de cáncer colorectal (HCT-116, SW-480 y HT-29), las crocinas inhibieron el crecimiento de células malignas, no afectando el crecimiento de las normales (García-Olmo y col., 1999).

#### **1.1.6.2. Enfermedades del sistema cardiovascular**

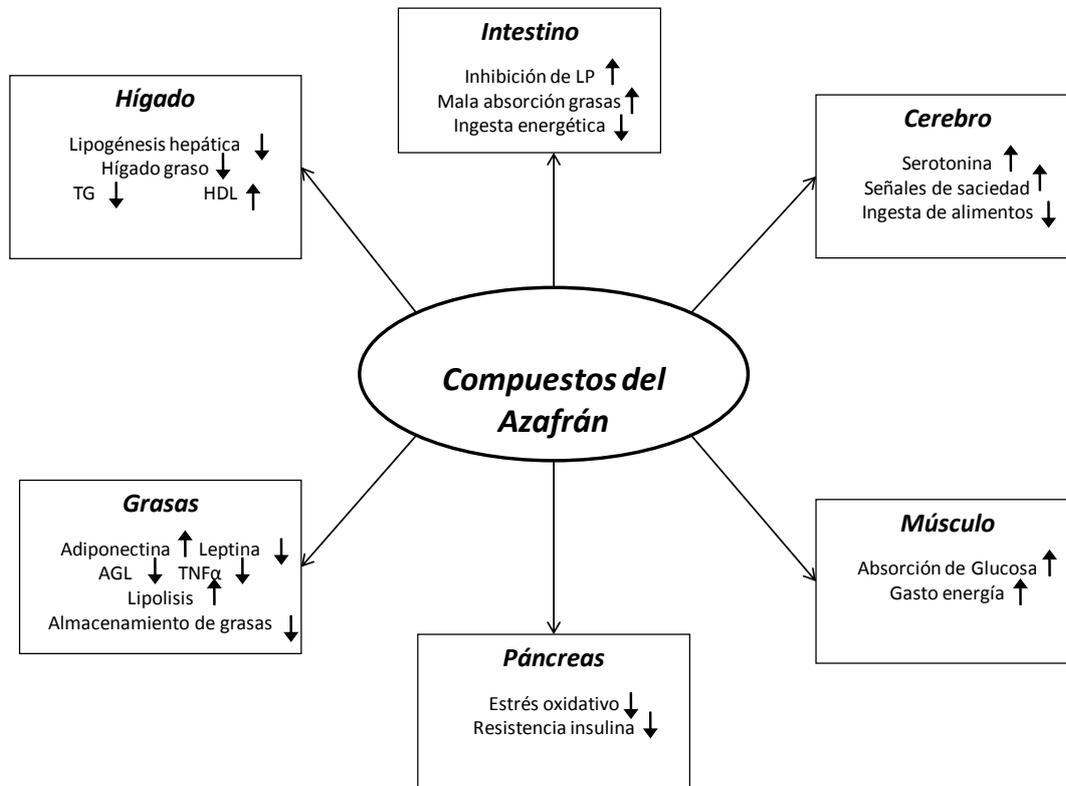
Diversos estudios ponen de manifiesto el efecto potencial del azafrán en el tratamiento de enfermedades del sistema cardiovascular. En la aterosclerosis, la más común de la arterioesclerosis, se demostró que la crocetina, incrementa la difusión de oxígeno en el plasma sanguíneo, compensando la disminución causada por un elevado nivel de colesterol, por lo que ha mostrado tener efecto contra la arteriosclerosis y como reductor de los niveles de colesterol en sangre (Gainer y Chisolm, 1974; Gainer y Jones, 1975; Miller y col., 1982), también se ha estudiado el aumento de la oxigenación de diversos tejidos por Gainer y Nugent (1976); DiLuccio y Gainer (1980); Seyde y col. (1986); Holloway y Gainer (1988); Gainer y col. (1993). Así mismo, se ha observado que la acción de los extractos de azafrán y crocinas, mejoran el perfil lipídico (Mashmoul y col., 2013; Samarghandian, 2014 b).

Ya en 1977 Hänsel, evidenció efectos del azafrán en la asimilación de los lípidos. Los resultados del estudio *in vivo*, llevado a cabo por Sheng y col. en 2006, sugieren un efecto hipolipemiante de las crocinas. Los resultados indican que, aunque las crocinas no bloquean directamente la absorción de colesterol, sí podrían inhibir selectivamente la actividad de la lipasa pancreática como un inhibidor competitivo.

Se han encontrado relaciones inversas entre una dieta con alta capacidad antioxidante total y la adiposidad central, estrés oxidativo, bio-marcadores, y riesgo de enfermedades cardiovasculares (Vincent y col., 2007; Abete y col., 2011; Hermsdorff y col., 2011). Hay estudios sobre la absorción de lípidos y la disminución de la obesidad en ratas (Noorbala et al., 2005), con mejora en el perfil lipídico a través de la acción de extractos acuosos de azafrán (20, 40 y 80 mg/kg) y crocinas (25 a 100 mg / kg / día) (Mashmoul y col., 2013; Samarghandian y col., 2014). Además, se ha demostrado que la crocetina es capaz de prevenir el estado proinflamatorio que ocurre en la obesidad, al disminuir la expresión de TNF- $\alpha$  y aumentar la adiponectina en el tejido adiposo de ratas alimentadas con fructosa (Xi y col., 2007). En otro estudio, también en ratas, la administración de crocetina evitó la acumulación de grasa visceral y la resistencia a la insulina inducida por la dieta hipercalórica, sin que se viera afectado el consumo de alimento (Sheng y col., 2008).

Hay estudios que afirman que puede perderse peso consumiendo azafrán (Gout y col., 2010). Las hipótesis sobre el mecanismo de acción sugieren varias vías: el bloqueo de la digestión de grasas en la dieta a través de la inhibición de la lipasa pancreática, que actúa como un antioxidante, y la supresión de citoquinas inflamatorias y la diferenciación de adipocitos; la supresión de la ingesta de alimentos mediante el aumento de la saciedad, o la sensación de plenitud debido a la elevación del nivel de los neurotransmisores o funciones hormonales; y el aumento de la glucosa y el metabolismo de los lípidos. La *Figura 15* muestra un esquema de los posibles mecanismos del efecto anti-obesidad en el estudio realizado por Masmhoul y col. (2013) para evaluar el papel potencial del azafrán y

sus constituyentes en la regulación de las funciones metabólicas, pudiendo alterar de manera beneficiosa la fisiopatología de la obesidad.



LP: Lipasa Pancreática; TG: Triglicéridos; HDL: Lipoproteínas de alta densidad;

AGL: Ácidos grasos libres; TNFα: factor de necrosis tumoral alfa.

Figura 15. Posibles efectos antiobesidad de los componentes del azafrán (Masmhoul y col., 2013)

### 1.1.6.3. Función hepática

Se describen efectos hepatoprotectores en estudios *in vivo* donde las crocinas atenúan la activación de las caspasas, mediadores esenciales de la apoptosis o muerte celular, y la reducción de la relación entre la proteína proapoptótica bax y la antiapoptótica Bcl-2 (bax/Bcl-2), lo que reduce la hepatotoxicidad (Lari y col., 2015).

#### **1.1.6.4. Otros efectos**

Además de la actividad reflejada hay estudios que atribuyen al azafrán acción antiinflamatoria (Hosseinzadeh y Younesi, 2002), anticonvulsivante (Hosseinzadeh y Talebzadeh, 2005), antihistamínica, antiasmática, genoprotectora, antitusiva, protectora de la mucosa gástrica y de la disfunción sexual (Licón y col., 2010).

#### **1.1.7. Azafrán como alimento funcional. dosificación para una intervención nutricional**

Muchos alimentos se han relacionado tradicionalmente con efectos beneficiosos y hasta medicinales. El azafrán es una especia utilizada desde hace miles de años, tanto por sus cualidades alimenticias como por sus efectos medicinales (Alonso y col., 1998; Mazza, 1998; Carmona y col., 2006a; Ulbricht y col., 2011; Hosseinzadeh y Nassiri-Asl, 2013).

Se utilizan numerosos términos para referirse a los productos alimenticios, que supuestamente presentan efectos beneficiosos para la salud: alimentos funcionales, alimentos de diseño, productos nutracéuticos, alicamento, farmaalimento, etc. Considerando lo que dicta la normativa los denominaremos nuevos alimentos, alimentos médicos, suplementos alimentarios e hierbas o plantas medicinales (Mazza, 2000). Es ilustrativo que ya en 1999 la revista "Nature Biotechnology" dedicara una reflexión a los "agricultural" (Goldberg, 1999).

La investigación de los efectos del azafrán, el comportamiento de sus componentes fitoquímicos responsables, el establecimiento de la dosis y seguridad de uso, permitirá la utilización del azafrán como alimento funcional, atribuyéndole acciones beneficiosas en el organismo que deriven en mejoras del estado de salud y bienestar y/o una reducción del riesgo a desarrollar enfermedades degenerativas.

La correcta dosificación del azafrán es imprescindible para garantizar la seguridad y la obtención de efectos. La mayoría de los estudios se realizan *in vitro*

e *in vivo* y la extrapolación a dosis humana equivalente refleja unas dosis con una variabilidad enorme.

En algunos casos, las dosis mencionadas en los estudios, son aceptables para ser administradas en la alimentación, pero en otros casos, especialmente en estudios con safranal, las dosis son inasumibles, siempre considerando que serán administradas en la alimentación y no como tratamiento (Licón y col., 2010).

La seguridad del azafrán especia se apoya en su uso como aditivo alimentario, por su color y sabor, durante siglos, además de que tradicionalmente se han utilizado sus extractos y tinturas en el tratamiento de enfermedades, sin efectos tóxicos secundarios (Bolhassani y col., 2014).

El extracto de la monografía sobre el azafrán de la Comisión Europea de 1987 habla de los riesgos de su uso: “a dosis diaria máxima de 1,5 gramos no ha sido documentado ningún riesgo. La dosis letal es de 20 g y la abortiva, de 10 g, pues como tal se empleó antiguamente debido a su acción estimulante sobre la musculatura lisa del útero. Dosis del orden de 5 g diarios pueden provocar ya intoxicaciones acompañadas de vómitos, diarrea sanguinolenta, hematuria, hemorragias cutáneas en nariz, labios y párpados, vértigo y entorpecimiento. La piel y las mucosas toman coloración amarilla semejante a ictericia”.

No obstante, en los últimos tiempos, y como consecuencia de su utilización en ensayos clínicos, se han realizado numerosos estudios para evaluar su posible toxicidad en animales de experimentación y en estudios *in vitro* (Srivastava y col., 2010), sin observarse, en ninguno de ellos, cambios importantes en los parámetros hematológicos o bioquímicos que pudieran sugerir toxicidad (Modaghegh y col., 2008).

Dosis altas de azafrán deben evitarse durante el embarazo. Las cantidades de más de 5 g, muy superiores a las utilizadas en los alimentos, pueden ser estimulantes uterinos y tener efectos abortivos (Brinker y col., 1998; Ernst y col., 2002).

El azafrán tiene evaluada su seguridad en un estudio con 400 mg diarios en tabletas en voluntarios sanos divididos en 3 grupos durante 7 días. Este trabajo muestra que el azafrán puede cambiar algunos parámetros hematológicos y bioquímicos, pero esta variación se encontró dentro de los rangos normales y no supuso alteraciones clínicas (Modagheh y col., 2008).

Diversos estudios experimentales en ratas han puesto de manifiesto que altas dosis no suponen altas toxicidades (Wang, 1984). Un estudio evaluó la toxicidad aguda del azafrán en 32 ratones preñados. Se administró por vía oral mediante sonda, 500, 1.000 y 2.000 mg/kg/día de azafrán durante tres semanas, a cuatro grupos de madres. Al grupo control le fue suministrada una solución salina normal. Se evaluaron en los neonatos la nefrotoxicidad y hepatotoxicidad. Los resultados indicaron que el azafrán es una especia segura sin efecto tóxico en el hígado, pero la administración de altas dosis de azafrán a las madres, podría dañar los riñones de los recién nacidos (Bahmani, 2014).

La dosis letal media (LD50) del azafrán es de 200 mg/ml y 20,7 g/kg, *in vitro* y en estudios con animales, respectivamente (Khazdair y col., 2015).

La administración conjunta de extracto acuoso de azafrán y safranal disminuye los efectos de toxicidad aguda y subaguda del safranal. Reduce la mortalidad y mejora los efectos tóxicos del safranal sobre marcadores bioquímicos específicos. En base a estos resultados se podría recomendar el consumo del extracto acuoso del azafrán especia con más seguridad que el safranal sólo (Ziaee, 2014).

La interacción del azafrán con medicamentos no está estudiada. Es conocido que la crocetina se une fuertemente a la albúmina sérica, pero el desplazamiento de fármacos en plasma no se ha evaluado todavía (Miller y col., 1982; Kanakis y col., 2007). Un estudio *in vitro* observó que el extracto acuoso de azafrán inhibía la agregación de plaquetas humanas (Gardner y col., 2013).

Dosis de 30 mg diarios utilizadas en ensayos clínicos sobre los efectos en depresión no han mostrado diferencias de tolerancia en relación con el placebo, aunque algunos de los efectos adversos fueron náuseas, vómitos y dolor de cabeza (Abdullaev y col., 2004; Schmidt y col., 2007).

## 1.2. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica del sistema nervioso central (SNC) que integra inflamación y neurodegeneración, afectando a la sustancia blanca (SB) y sustancia gris (SG) del cerebro y a la médula espinal. Es de probable base autoinmune mediada por linfocitos T autoreactivos frente a diferentes antígenos del complejo mielina-oligodendrocito, que, tras penetrar en el SNC, inducen una cascada de fenómenos inmunológicos que llevarán a la ruptura de las vainas de mielina (*Figura 16*). La desmielinización ralentiza o bloquea la transmisión neurológica, lo cual tiene devastadores efectos en las funciones motoras, sensoriales y cognitivas (Ninds, 2015).

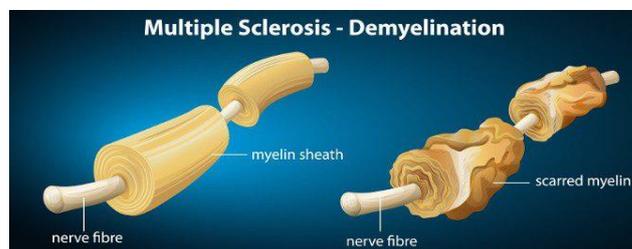


Figura 16. Fibra nerviosa desmielinizada. Imagen tomada de <http://esclerodiario.blogspot.com.es>

El interés por la enfermedad hace que surjan sociedades dedicadas a la investigación de su patogénesis, prevención de la progresión y tratamiento. En 1946 en Estados Unidos, especialistas en neurología y pacientes fundan la National Multiple Sclerosis Society (NMSS). Posteriormente aparece la American Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ACTRIMS) y en 1982, en Europa ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis). En 1981 comenzó a funcionar en España la Asociación Española de Esclerosis Múltiple (AEDEM-COCEMFE), asociación reconocida jurídicamente

desde 1984 como entidad sin ánimo de lucro que reúne a los afectados de EM, sus familias y personas sensibilizadas con esta enfermedad. Esta asociación, con sedes en toda la geografía española, promueve acciones e información destinada a mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por esta enfermedad.

La EM es el resultado del daño a la mielina, fibras nerviosas y neuronas en cerebro y médula espinal, pero su etiología es aún desconocida. Tampoco se conoce todavía un marcador biológico de la enfermedad (Lauer, 2010).

La mielina que envuelve los axones neuronales, formada por lípidos y proteínas, posee capacidad antigénica y en la EM es destruida como resultado de una anormal reacción autoinmune. La “hipótesis de higiene” explica que las enfermedades autoinmunes, aumentan su incidencia y prevalencia al tiempo que disminuyen las infecciones debido al descenso de infecciones infantiles que determinaría las condiciones necesarias para el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Hogancamp y col., 1997).

Los estudios epidemiológicos realizados no son capaces de explicar por sí mismos la causa y ante el aumento de la prevalencia e incidencia, señalan dos hipótesis, no autoexcluyentes y complementarias, para explicar su etiología: una combinación de vulnerabilidades genéticas (hipótesis genética) y factores ambientales (hipótesis ambiental) (Fernández y Fernández, 2007).

El estudio genético, International Multiple Sclerosis Genetic Consortium (IMSGC), ha genotipado el ADN de más de 10.000 pacientes de EM y una vez sea conocido el listado de genes se clarificará el riesgo genético de la EM (Swacer, 2010).

La mayor susceptibilidad de las mujeres sobre los hombres sugiere la influencia de las hormonas sexuales en la enfermedad como lo demuestra que durante la gestación, especialmente en el último trimestre, disminuye la actividad de la enfermedad, coincidiendo con el aumento de los niveles de estrógenos (Vukusic, 2004).

La hipótesis ambiental está avalada por una prevalencia variable alrededor del mundo con mayores frecuencias entre las latitudes 40º-60º del hemisferio Norte (Escandinavia, Gran Bretaña) y mínima a nivel del Ecuador, relacionándolo con la exposición a los rayos solares.

Hay una fuerte asociación con el virus de Epstein-Barr (anti-EBNA IgG seropositivo) (Belbasis y col., 2015). También se ha encontrado una asociación muy fuerte de la enfermedad con la bacteria *Clamydophila pneumoniae*, identificada en el líquido cefalorraquídeo del 64% de los pacientes (Gutiérrez y col., 2004).

### **1.2.1. Sintomatología**

La desmielinización reorganiza o reduce los canales de sodio, lo que produce dos efectos, la inhibición de la transmisión del impulso nervioso, cuando afecta a segmentos largos del axón, y el aumento de la excitabilidad, lo que explica los fenómenos paroxísticos (parestesias persistentes, fenómeno de Lhermitte, fosfenos de la neuritis óptica). La transmisión nerviosa es ralentizada, dando lugar a los síntomas transitorios, o bloqueada, lo que origina los síntomas permanentes.

La EM se caracteriza por presentarse en forma de brotes, seguidos de remisiones, y por la tendencia a la repetición o recurrencia de los mismos. El 90% de los pacientes de EM cursan con brotes. Los brotes, son episodios de disfunción neurológica caracterizados por síntomas y signos objetivos, con una duración de 2 a 5 días y mayor de 24 horas y en ausencia de algún factor desencadenante por infecciones o cambios de temperatura, lo que se consideraría un pseudobrote (Fernández y col., 2005). La *Tabla 3* refleja los síntomas más frecuentes que se presentan en la EM.

Tabla 3. Síntomas en el curso de la enfermedad y frecuencia de los mismos expresado en porcentaje (Porras-Betancourt y col., 2017)

Síntomas	Frecuencia (%)
<b>Alteraciones motoras</b>	
Debilidad muscular	65-100
Espasticidad	73-100
Alteración reflejos	62-98
Fatiga	59-85
<b>Alteraciones sensitivas</b>	
Vibración	48-82
Termoalgesia	16-72
Dolor	11-37
Signo de Lhermitte	1-42
<b>Alteraciones cerebelosas</b>	
Ataxia	37-78
Disartria	29-62
Temblor	36-81
Nistagmo	54-73
<b>Síntomas visuales</b>	
Neuritis óptica	40-70
<b>Alteraciones psiquiátricas</b>	
Depresión	8-55
Euforia	4-18
<b>Alteraciones cognitivas</b>	
	11-59
<b>Otros</b>	
Alteraciones esfinterianas	49-93
Disfunciones intestinales	39-64
Disfunciones sexuales	33-59

Además de éstos, aparecen otros signos y síntomas como alteraciones genito-urinarias (Elizondo y col., 2017), alteraciones cognitivas, alteraciones del estado emocional (depresión y/o ansiedad) (Matias-Guiu y col., 2017), epilepsia (3-9%), trastornos paroxísticos y fatiga (Ploughman, 2017).

### 1.2.2. Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la anamnesis, exploración física (signos visuales, sensoriales o problemas motores), resonancia magnética (RM), estudio citoquímico y determinación de bandas oligoclonales (BOC) en líquido cefalorraquídeo (LCR), y potenciales evocados visuales (PEV).

En el LCR, obtenido mediante punción lumbar, el hallazgo más común es la presencia de un aumento de la síntesis intratecal de la IgG de la gammaglobulina y la detección de bandas oligoclonales (BOC) en la fracción IgG en el 95% de los pacientes de EM, aunque no es exclusiva de la EM, ya que también puede estar presente en enfermedades infecciosas o inflamatorias del SNC (Freedman y col., 2005; Prieto y Yuste, 2015). La síntesis de IgG intratecal es una fuerte evidencia de la EM, ya que se presenta en la enfermedad reciente y se considera el criterio biológico de diagnóstico más fuerte de la enfermedad. Se observa un índice de IgG elevado o BOC positivas en más del 95% de los pacientes con EM (Ferraro y col., 2017) (Figura 17).

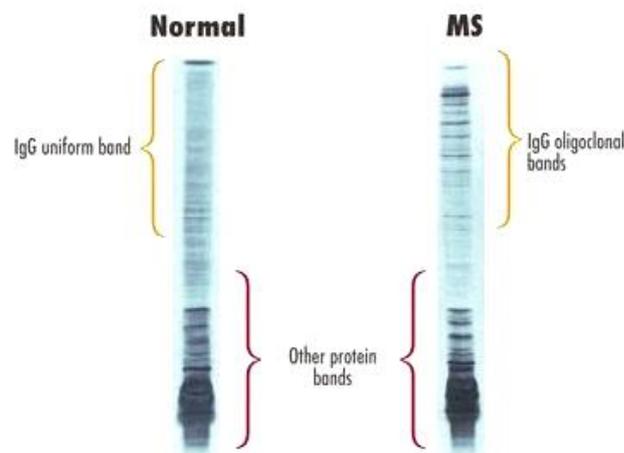


Figura 17. Bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo. Imagen tomada de <https://neuronavasms.blogspot.com.es>

La exploración de imagen de resonancia magnética (RMI) de las lesiones cerebrales es de vital importancia porque detecta las lesiones inflamatorias antes

de que sean lesiones desmielinizantes. La Figura 18 muestra el estudio de un paciente, apreciándose durante el brote las áreas hiperintensas de las lesiones.

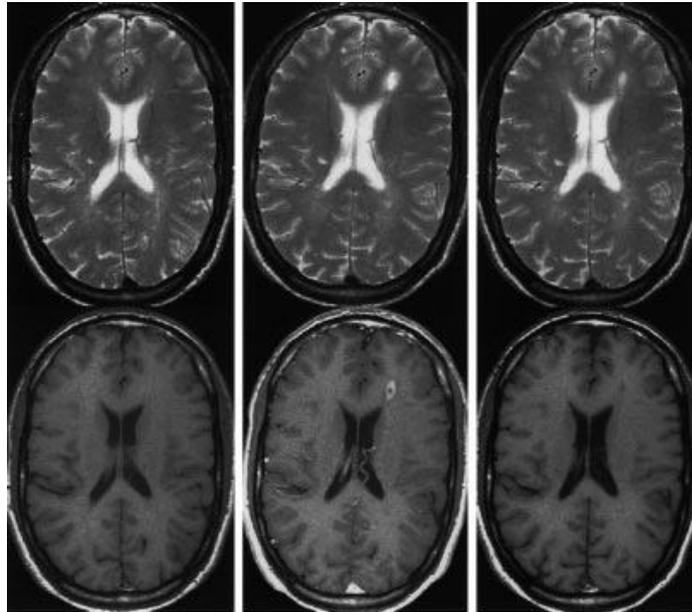


Figura 18. Estudio evolutivo con RMI (secuencias transversales potenciadas en T2 y T1 con contraste) en un paciente con EM clínicamente definida: basal, 2 meses y 4 meses (El control posterior muestra la desaparición del realce y la disminución en el tamaño de la lesión (Figura 18)). (Unidad de Resonancia Magnética Vall d'Hebron (I.D.I.). Departamento de Radiología. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona)

Los potenciales evocados (PE) son señales físicas que, con una exploración neurofisiológica no invasiva a través de técnicas como la electroencefalografía o la electromiografía, recogen la respuesta eléctrica del SNC tras la estimulación de un órgano sensorial. Los más utilizados son los potenciales evocados visuales (PEV), que están alterados en el 85% de los pacientes de EM (Fernández y col., 2005).

### 1.2.3. Formas clínicas

En 1996 el “US National Multiple Sclerosis Society (NMSS) Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple Sclerosis” consensuó y definió 4 subtipos clínicos de EM en base a la encuesta internacional de expertos en EM (Lublin y col., 1996). Desde entonces son los utilizados en la práctica clínica y los seguidos en los criterios de inclusión de la mayoría de los ensayos clínicos:

- ✓ En brotes o Recurrente Remitente (EMRR)
- ✓ Secundaria Progresiva (EMSP)
- ✓ Primaria Progresiva (EMPP)
- ✓ Progresiva Recurrente (EMPR)

“The 2013 revisions” (Lublin y col., 2014), considera que deben mantenerse las descripciones fenotípicas de 1996, pero con clarificaciones y modificaciones basadas en la **actividad** de la enfermedad y la **progresión** de la misma, que facilitan el pronóstico, las decisiones terapéuticas y los diseños y resultados de los ensayos clínicos

La *Tabla 4* recoge las nuevas definiciones propuestas por el NMSS que ayudan a delimitar los fenotipos de EM.

Tabla 4. Definiciones para identificar los fenotipos de EM (Lublin y col., 2014)

**Enfermedad activa**

**Clínica:** Recaídas, nuevos episodios agudos o subagudos, o aumento de la disfunción neurológica seguidos de una recuperación total o parcial, en ausencia de fiebre o infección

**y/o**

**Imagen (RMI):** Contraste de lesiones hiperintensas T1 o nuevas e inequívocas ampliaciones de las lesiones hiperintensas en T2.

**Progresión de la enfermedad**

**Clínica:** En constante aumento, documentada la disfunción neurológica /discapacidad de manera objetiva y sin recuperación inequívoca (fluctuaciones y las fases de estabilidad pueden repetirse)

**Imagen (RMI):** La medida de la progresión no está, todavía, establecida en imágenes y no puede usarse para describir el fenotipo del paciente de forma individual. Se considerará el aumento del número y volumen de las lesiones T1 hiperintensas y los cambios en la transferencia de imágenes magnética y las imágenes de tensor de difusión nuevas y la ampliación de lesiones T2.

**Empeoramiento de la enfermedad**

Incremento documentado de la disfunción/discapacidad neurológica como resultado de las recaídas o la progresión de la enfermedad, reservando el término para los casos de enfermedad progresiva.

**Confirmar progresión o empeoramiento**

Incremento de la disfunción neurológica confirmado a lo largo de un intervalo de tiempo definido (3, 6, o 12 meses). Debido a que la disfunción neurológica todavía puede mejorar (especialmente en la enfermedad recurrente), incluso si la progresión se confirma más de 6 o 12 meses, se recomienda abandonar el término prolongado.

La nueva caracterización de los fenotipos de EM debe considerar la **actividad** de la enfermedad, basada en la ratio de brotes o recaídas y/o la actividad detectada en RMI de las lesiones en el SNC, y en la **progresión** de la enfermedad (Lublin y col., 2014).

Los nuevos criterios de la “*The 2013 revision*” clasifican los fenotipos para la EM en brotes en Síndrome Clínico Aislado (SCA) y Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente (EMRR) (*Figura 19*):

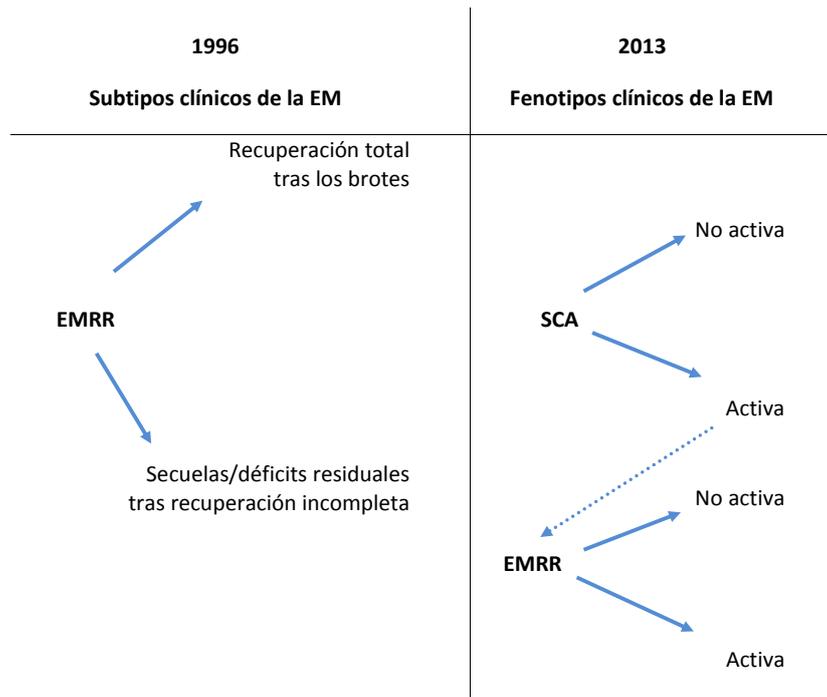


Figura 19. Fenotipos de la EM en brotes, 1996 vs 2013 (Lublin y col., 2014)

Los fenotipos para la EM progresiva se especifican en la *Figura 20*: Formas activas y con progresión, Formas activas pero sin progresión, Formas no activas pero con progresión y Formas no activas y sin progresión (estabilidad de la enfermedad).

Así clasificaremos la enfermedad Progresiva en:

**EM Primaria Progresiva (EMPP):** Con acumulación progresiva de la discapacidad desde el inicio de los síntomas, con relativamente pocos ataques o periodos de actividad, o sin ellos, pero con un empeoramiento gradual. Entre 10-20% de los pacientes la presentan. Es más frecuente en hombres, alrededor de los 40 años y es la forma de peor pronóstico.

**EM Secundaria Progresiva (EMSP):** Con acumulación progresiva de la discapacidad en función de la severidad de los brotes y de las secuelas de los mismos.



inmunomodulador/inmunosupresor con el fin de modificar el curso de la enfermedad y tratamiento sintomático:

La primera terapia utilizada, en 1993, fueron los inmunomoduladores para el **tratamiento de los brotes** de la EM. Hoy el conocimiento en el tratamiento ha avanzado mucho con el desarrollo de terapias con base inmunológica y de fármacos efectivos capaces de reducir la actividad de la enfermedad (Fernández y col., 2005).

El **tratamiento crónico o modificador de la enfermedad** se utiliza para disminuir el número y gravedad de los brotes y prevenir o retrasar la progresión de la discapacidad neurológica. Cuanto más pronto se instaure el tratamiento mejor será la prevención de la actividad lesional y la progresión de la discapacidad (García Merino y col., 2013; Liu y col., 2017; Armoiry y col., 2018).

Se utiliza un tratamiento escalonado iniciado con fármacos de primera línea, que son fármacos suaves y seguros y en formas severas y progresivas, cuando estos no responden y persiste la actividad inflamatoria se utilizan los de segunda línea. Los fármacos disponibles sólo han sido útiles en las formas clínicas de EMRR y EMSP con brotes (Federación Internacional de EM, 2016). En 2016 había 12 medicamentos aprobados por la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento modificador de la EM, recogidos en la *Tabla 5*. Numerosos artículos avalan su uso (Polman y col., 2006; Goodin y col., 2007; Marriot y col., 2010; García Merino y col., 2013; Manceñido y Carpio, 2012; Sánchez-Seco y col., 2014; Pavsic y col., 2015; Kappos y col., 2016; Zettl y col., 2018; Cohen y col., 2018).

Tabla 5. Tratamientos modificadores de la EM aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (AEM) marzo 2016

Principio activo	Nombre comercial	Dosis	Vía y frecuencia
IFN $\beta$ -1a	<i>Avonex</i> <sup>®</sup>	30 mcg	IM 1/semana
IFN $\beta$ -1a	<i>Rebif</i> <sup>®</sup>	22 ó 44 mcg	SC 3/semana
IFN $\beta$ -1b	<i>Betaferón</i> <sup>®</sup>	250mcg	SC.cada 2 días
IFN $\beta$ -1b	<i>Extavia</i> <sup>®</sup>		SC.cada 2 días
IFN $\beta$ -1a pegilado	<i>Plegridy</i> <sup>®</sup>		SC.cada 2 semanas
Acetato de Glatirámero	<i>Copaxone</i> <sup>®</sup> 20 o 40	20mg	SC diario o 3/semana
Teriflunamida	<i>Aubagio</i> <sup>®</sup>		O diario
Dimetilfumarato	<i>Tecfidera</i> <sup>®</sup>		O 2/día
<b>2ª línea</b>			
Mitoxantrona	<i>Novantrone</i> <sup>®</sup>	12 mg	IV Variable
Natalizumab	<i>Tysabri</i> <sup>®</sup>	300 mg	IV cada 4 semanas
Fingolimod	<i>Gilenya</i> <sup>®</sup>		O Diario
Alemtuzumab	<i>Lemtrada</i> <sup>®</sup>		IV ciclos 5 o 3 días/año

IM= Intramuscular; O= Oral; IV= Intravenosa; SC= Subcutánea

La EM cursa con una gran variedad de síntomas que condicionan la CV de estos pacientes. En el **tratamiento sintomatológico** se utilizan una serie de medicamentos dirigidos a sus necesidades físicas y psicológicas reflejados en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Tratamiento sintomático de la EM (Federación Española de EM, 2016)

<b>Síntoma</b>	<b>Fármaco</b>
<b><i>Fatiga</i></b>	Amantadina Modafinilio Metilfenidato Pemolina
<b><i>Espasticidad</i></b>	Baclofeno oral e intratecal Tizanidina Diazepam Gabapentina Cannabinoides/Nabiximols Toxina botulínica A
<b><i>Capacidad de marcha</i></b>	Aminopiridinas/Fampridina
<b><i>Dolor neuropático</i></b>	Gabapentina Carbamazepina Amitriptilina Pregabalina
<b><i>Déficit cognitivo</i></b>	Donepezilo Interferón beta Acetato de glatirámero Rivastigmina Memantina
<b><i>Disfunción vesical</i></b>	Oxibutinina Tolterodina Desmopresina

### **1.3. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA INFLUENCIA DE LA DIETA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La influencia de la nutrición en la patogénesis de la EM todavía no ha sido demostrada, y el efecto de una intervención nutricional sobre el estado inflamatorio y el bienestar de los pacientes con EM no está asociado a ningún tipo de recomendación dietética (Riccio, 2015).

Los estudios anteriores a 2005 no describían adecuadamente las posibles relaciones entre dieta y EM, y los resultados obtenidos generalmente hacían referencia a macronutrientes. Sin embargo, se sabe que la ingesta de ácidos grasos saturados (SFA) de origen animal debe controlarse para evitar el aumento de los procesos inflamatorios en la EM (Riccio y col., 2015) y hay un resurgimiento del interés entre los investigadores de EM en el potencial terapéutico de la dieta baja en grasas y la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), pues podrían tener algún efecto beneficioso en la enfermedad (Yadav y col., 2005). Un alto índice de masa corporal (IMC) antes de los 20 años se asocia con un riesgo significativamente mayor de EM (Riccio y col., 2015).

El papel de los minerales, elementos traza, antioxidantes, y vitaminas, ha supuesto un gran interés en la última década, pero aún es incierta su influencia en la EM. Por ejemplo, un aumento del riesgo de EM en pacientes con insuficiente vitamina D puede explicar la fuerte asociación entre la latitud geográfica y la prevalencia de la EM. Altas concentraciones de vitamina D parecen disminuir la progresión de la enfermedad (Ascherio y Munger, 2014). Se desconoce si los antioxidantes de la dieta tienen propiedades biológicas adicionales que van más allá de la simple actividad antioxidante en la EM. La utilización de antioxidantes en la EM, enfermedad autoinmune e inflamatoria, se basa en la observación de que el estrés oxidativo es uno de los componentes más importantes del proceso inflamatorio, que conduce a la degradación de la mielina y el daño axonal (von Geldern y col., 2012). Un estudio reciente indica que la intervención nutricional con alimentos antiinflamatorios y suplementos dietéticos disminuye la síntesis biológica de compuestos proinflamatorios y con ello hace más efectivo el uso de

fármacos inmunomoduladores, mejorando el bienestar de los pacientes con EM (Riccio y col., 2015). El estudio de Riccio y col. (2016) observó que, tras 6 meses de intervención con una dieta antiinflamatoria, si bien no hubo cambios en los signos neurológicos, si decreció la metaloproteinasa-9 en el 59% de los pacientes con EMPP y un 51% en EMRR, lo que indica que esta intervención mejoró su estado inflamatorio.

En el tratamiento de la enfermedad los clínicos recomiendan a los pacientes con EM, tal como hacen a la población general, seguir una dieta saludable basada en los estudios que apuntan un efecto protector de ciertos patrones dietéticos (Hadgkiss y col., 2015). Las evidencias sobre hábitos dietéticos que disminuyen los síntomas de la EM pueden considerarse posibles tratamientos complementarios en la EM. Así mismo, el conocimiento de los hábitos alimenticios perjudiciales, podría evitar el estado crónico de inflamación y el agravamiento de la enfermedad (Riccio y col., 2013).

Numerosos estudios en la literatura consideran que la nutrición es uno de los posibles factores ambientales que intervienen en la patogénesis de la EM, sin embargo, el papel de la dieta en la enfermedad no está suficientemente probado (Riccio, 2011). A pesar de ello, son numerosos los pacientes que utilizan terapias alternativas con dietas y complementos dietéticos (Leong y col., 2009; Masullo y col., 2015; Schwarz, y col., 2008).

Se llevó a cabo una revisión sistemática, de todos los artículos publicados en la pasada década (2005-2015), sobre la influencia de la dieta en la EM. La búsqueda bibliográfica se realizó en Medlars Online International Literature (MEDLINE), vía PubMed y Scopus (Bagur y col., 2017a). Después de un proceso de selección (*Figura 21*), 267 artículos se rechazaron y 47 fueron seleccionados para su revisión y discusión.

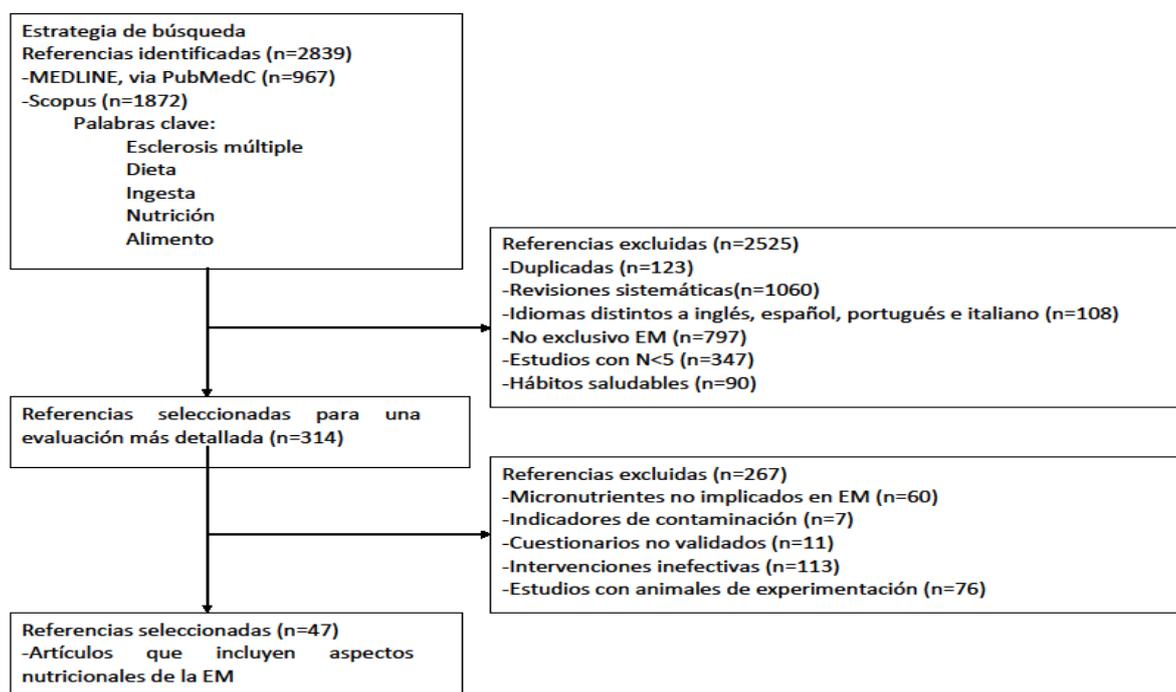


Figura. 21 Diagrama de flujo que muestra la búsqueda bibliográfica

Las características de los estudios seleccionados se presentan en la *Tabla 7*, agrupados en dieta, ácidos grasos y vitaminas. Esta *tabla* presenta una descripción de los cuarenta y siete estudios seleccionados para esta revisión, incluidas las referencias, el método utilizado, el país, la fecha de la encuesta, el número de pacientes, el sexo y el rango de edad. Todos los artículos fueron publicados entre los años 2005 y 2015. El tamaño de muestra varía de 9 (Mauriz y col., 2013) a 35.794 (Mirzaei y col., 2011), siempre mostrando un mayor número de mujeres que de hombres, aunque algunos estudios no reflejan este hecho, 14 de los 47 estudios son europeos, 13 artículos son iraníes y 10 de EE.UU. Se revisaron, artículos con ensayos clínicos (27) y estudios observacionales (20), generalmente, cohortes de población. Los ensayos clínicos revisados, en su mayoría, tienen un grupo de control. Los estudios poblacionales fueron respaldados por estudios observacionales de cohortes, como el “Nurses Health Study” y el “Nurses’ Health Study II” y los cuestionarios autoadministrados.

Son 17 los artículos revisados que hacen referencia a las características de la dieta de estos enfermos, en relación a sus nutrientes con la clínica, la malnutrición, o la etiología de la EM. 13 son estudios observacionales y sólo 4 ensayos clínicos (Ramsaransing y col., 2009; Salemi y col., 2010; Rezapour-Firouzi y col., 2014; Mähler y col., 2015). Hay 6 artículos que evalúan la ingesta de algún tipo de macronutrientes (Mohammad-Shirazi y col., 2007; Massa y col., 2013; Bagheri y col., 2014; Hadgkiss y col., 2015; Masullo y col., 2015; Mähler y col., 2015), 1 que estudia la variación estacional de éstos (Watson y col., 2007), y 3 el uso de terapias alternativas con dietas y complementos dietéticos (Leong y col., 2009; Masullo y col., 2015; Schwarz, y col., 2008).

Tabla 7. Descripción de los estudios incluidos en la revisión

Referencia	Método <sup>1</sup>	País	Año de estudio	Nº de pacientes			Rango de edad
				♂	♀	Total	
<b>DIETA</b>							
Bagheri y col., 2014	EO	Irán	2012-2013	nd	nd	113	20-50
Farez y col., 2015	EO	Argentina	n.d.	n.d.	n.d.	70	n.d.
Hadghiss y col., 2015	EO	Australia	n.d.	366	1697	2063	>18
Jahromi y col., 2012	EO	Irán	n.d.	0	75	75	n.d.
Leong y col., 2009	EO	Australia	n.d.	74.	195	269	n.d.
Massa y col., 2013	EO	USA	1980-2005	0	282	282	30-55
Masullo y col., 2014	EO	USA	nd	3	32	34	>18
Mohammad-Shirazi y col., 2007	EO	Irán	2005	26	82	108	33,15 <sub>3</sub>
Mähler y col., 2015	EO	Alemania	nd	8	8	16	35-61
Norverdt y col., 2005	EC	Noruega	1997-1999	25	62	87	40-47
Ramsaransing y col., 2009	EO	Holanda	n.d.	27	53	80	n.d.
Rezapour-Firouzi y col., 2014	EC	Irán	2010-2011	34	66	100	14-55
Saka y col., 2012	EO	Turquía	2011	15	22	37	n.d.
Salemi y col., 2010	EC	Italia	2004	20	20	40	16-58
Schwarz y col., 2008	EO	Alemania	2007	409	1164	1573	40-56
Sorgun et al., 2014	EO	Turquía	2000-2012	24	78	102	19-71
Watson y col., 2007	EO	Nueva Zelanda	n.d. <sub>2</sub>	0	214	214	18-35
<b>ÁCIDOS GRASOS</b>							
Jelinek y col., 2013	EO	Australia	n.d.	407	1896	2303	>18
Kampman y col., 2007	EO	Noruega	2003-2004	88	64	152	6-20
Mauritz y col., 2013	EC	España	n.d.	n.d.	n.d.	9	n.d.
Pantzaris y col., 2013	EC	Chipre	2007	20	60	80	18-65
Rezapour-Firouzi y col., 2013	EC	Irán	2010-2011	34	66	100	14-55
Shinto y col., 2009	EC	USA	n.d.	1	9	10	18-65

<sup>1</sup> La metodología puede ser ensayo clínico (EC) o ensayo observacional (EO); <sup>2</sup> n.d.: no dato; <sup>3</sup> edad promedio

### 1.3.1. Patrón dietético, consumo de energía y nutrientes

Saka y col. (2012) determinaron las ingestas medias diarias de energía en pacientes con EM, que fueron 2730 +/- 840.97 kcal en hombres y 1967 +/- 647.24 kcal en mujeres. El porcentaje de carbohidratos fue del 46,9%, las proteínas del 14,6% y las grasas de la energía total del 38,4%. Mohammad-Shirazi y col. (2007) observaron que la ingesta de proteínas y carbohidratos en la población estudiada era inferior a la recomendada, comparada con las recomendaciones de ingestas dietéticas de referencia (DRI), mientras que su ingesta diaria de grasa total y saturada era mayor que los valores de referencia. La ingesta de grasas poliinsaturadas y fibra dietética era inferior a la recomendada. Se sugiere un papel protector del consumo de frutas y verduras, grasas saludables y restricción de la carne, asociando significativamente a hábitos alimentarios saludables, mejores indicadores físicos y mentales (MSQOL-54) y menor nivel de discapacidad (Bagheri y col., 2014; Hadgkiss y col., 2015). Los datos de estudios prospectivos en mujeres: "Nurses Health Study", "Nurses Health Study II", entre 1986-1998, sobre estilo de vida y condiciones médicas y otros estudios observacionales realizados en 2005, no establecieron diferencias en el consumo de alcohol entre las pacientes con EM y la población general (Nortvedt y col., 2005; Massa y col, 2013).

### 1.3.2. Variaciones estacionales

Existe cierta evidencia acerca de que los nacidos en otoño presentan menor riesgo de desarrollar EM, frente a los que nacen en primavera. Se estudió si los cambios estacionales sobre la ingesta de nutrientes podrían afectar al desarrollo del feto a nivel celular y así impactar en el desarrollo de la descendencia. Los datos dietéticos se recogieron durante 2,9 años, durante el embarazo, a través de cuestionarios dietéticos, y mostraron que la ingesta de zinc, selenio,  $\beta$ -caroteno y vitamina C fue menor en verano. Las personas nacidas en primavera han sido concebidas en verano, lo que podría explicar la mayor incidencia de EM en los nacidos en esta temporada (Watson y col., 2007). La influencia de una menor ingesta de ciertos micronutrientes, como magnesio, calcio y hierro, así como una alta ingesta de sodio, puede estar relacionada con la progresión y actividad de la

enfermedad en pacientes con esclerosis múltiple progresiva secundaria (SPMS) (Ramsaransing y col., 2009; Farez y col., 2015).

### **1.3.3. Malnutrición y análisis clínicos**

Los pacientes con EM tienen un IMC medio significativamente más bajo (indicador de malnutrición) que el rango recomendado a pesar de los bajos niveles de actividad física. Esto podría estar relacionado con cambios en el metabolismo después de la aparición de la enfermedad o la atrofia muscular como resultado de una actividad muscular reducida como resultado de un deterioro neuronal (Nortvedt y col., 2005). La prevalencia de desnutrición crónica, utilizando el concepto de albúmina sérica <3.5 mg/dl, fue del 11,8%, en pacientes con EM y solo del 2% en pacientes de otras enfermedades crónicas (Sorgun y col., 2014).

Los análisis clínicos se han utilizado para identificar potenciales marcadores de la enfermedad. Se vio que los pacientes con EM en fase de estabilidad clínica tenían mayores concentraciones de homocisteína y HDL colesterol, y menos concentraciones de vitamina E y un menor ratio de vitamina E-colesterol (Salemi y col., 2010).

### **1.3.4. Suplementos dietéticos**

Los complementos alimenticios o intervenciones dietéticas en los enfermos de EM se utilizaron frecuentemente (64,7% de los casos), vitaminas (81,8%), ácidos grasos esenciales (80,7%) y minerales (62,5%), además de otros productos de herboristería como arándanos, extractos de semilla de uva, ginkgo biloba, ginseng, hierba de San Juan y valeriana. Estos pacientes consumidores de complementos ingieren una dieta más equilibrada (Leong y col., 2009). Se observa una mejoría en nivel de fatiga y metabolismo muscular durante el ejercicio moderado en los pacientes de EM con la ingesta de catequinas del té verde (Mähler, 2015). No se observa asociación entre la ingesta de cafeína y riesgo de EM (Massa y col., 2013). Otros estudios recogen una mayor utilización de terapias alternativas como la homeopatía, acupuntura, uso de complementos como la

coenzima Q 10, carnitina, melatonina, entre otros y/o dietas especiales, algunas demasiado restrictivas por parte de los pacientes (Schwarz y col., 2008; Leong y col., 2009; Masullo y col., 2015).

### **1.3.5. Ácidos grasos saturados**

Los artículos revisados sobre el efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en la enfermedad fueron: 2 estudios observacionales y 5 ensayos clínicos (*Tabla 7* y *Tabla 8*). Los ácidos grasos saturados e hidrogenados de los alimentos deben controlarse en la ingesta dietética para evitar el aumento del proceso inflamatorio en la EM. Una dieta baja en grasas con suplementos de antioxidantes obtuvo niveles de proteína C-reactiva significativamente más bajos que los observados en el grupo de placebo. El estrés oxidativo y los marcadores inflamatorios isoprostano 8-iso-PGF2 $\alpha$  (8-iso-PGF2  $\alpha$ ) y los valores de interleucina 6 (IL-6) también disminuyeron después de la intervención dietética, en contraste, la actividad de la catalasa se incrementó. Estos resultados sugieren que la dieta y los suplementos dietéticos de AGPI de cadena larga omega-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) están involucrados en la modulación del metabolismo celular y procesos inflamatorios relacionados (Shinto y col., 2009; Mauriz y col., 2013). Una dieta baja en grasas y suplementada con omega 3 disminuyó el número de recaídas y redujo la fatiga (Weinstock-Guttman y col., 2005), incluso hasta el 60% (Jelinek y col., 2013), lo que generó mejoras significativas en el EDSS de los pacientes y disminución del riesgo de desarrollar la enfermedad (Rezapour-Firouzi y col., 2013). Este hecho también se confirma cuando la dieta conlleva un enriquecimiento de vitamina A y E (Pantzaris y col., 2013). El consumo de AGPI de cadena larga, cuando la exposición al sol es menor, puede proteger el riesgo de EM, por ejemplo, la ingesta de semillas de sésamo, aceite de cáñamo y/o de onagra, hígado de bacalao y pescado tres o más veces a la semana durante la infancia y la adolescencia (Kampman y col., 2007; Rezapour-Firouzi y col., 2013).

Tabla 8. Dosis y duración de ácidos grasos poliinsaturados y vitamina D administrados en los ensayos clínicos

	<b>Dosis</b>	<b>Duración</b>	<b>Efectos</b>
<b>AGPI</b>			
Weinstock-Guttman y col., 2005	3.30 g/d AGS Omega-3	12 meses	Disminución nº brotes y fatiga
Shinto y col., 2009	4.8 g/d AGS Omega-3	3 meses	Regulación inmunomoduladora de los niveles de la metaloproteína 9 de matriz
Mauritz y col., 2013	200 mg/d antioxidante Dieta baja en grasas	1.5 meses	Disminución del estrés oxidativo, proteína C reactiva, y otros marcadores de inflamación.
Pantzaris y col., 2013	19.5 mL/d AGPI + $\gamma$ tocoferol	30 meses	Disminución nº brotes y progresión de la discapacidad
Rezapour-Firouzi y col., 2013	18-21 g/d AGPI	6 meses	Disminución de la interleuquina-17 y aumento de citoquinas antiinflamatorias.
<b>VITAMINA D</b>			
Wingerchuk y col., 2001	1000 UI/d	48 semanas	Disminuye el nº brotes. Mejora las lesiones cerebrales (RMI)
Kimball y col., 2007	4000-40000 UI/d	28 semanas	Disminuye el nº nuevas lesiones cerebrales (RMI)
Smolders y col., 2010	20000 UI/d	12 semanas	Papel inmunomodulador en EM.
Steffensen y col., 2011	2800 UI/d	96 semanas	No previene la pérdida de masa ósea en EM
Dörr y col., 2012	200-10200 UI/d	72 semanas	Inmunomodulador en EM
Kampman y col., 2012	2800 UI/d	96 semanas	Sin efectos
Soilu-Hänninen y col., 2012	2800 UI/d	12 semanas	Disminuye el nº nuevas lesiones cerebrales (RMI)
Toghianifar y col., 2015	7000 UI/d	12 semanas	Mejora la respuesta inflamatoria

### 1.3.6. Vitamina D

Numerosos artículos se refieren a la vitamina D (16), de los cuales 11 son ensayos clínicos y 5 estudios de cohorte observacionales (*Tabla 7*). Los niveles de vitamina D pueden estar condicionados por su biodisponibilidad, alteraciones metabólicas y/o funcionales, o incluso una baja exposición al sol. Una menor disponibilidad de vitamina D y/o exposición solar, su inductor más importante, se ha asociado con un alto riesgo de desarrollar EM, así como una mayor actividad clínica y un mayor riesgo de recaídas (Smolders y col., 2010). De hecho, la distribución geográfica de la enfermedad generalmente se asocia con la menor disponibilidad de vitamina D por la baja exposición al sol en países que tienen una cantidad significativamente mayor de casos de EM. Los niveles séricos de vitamina D fueron significativamente más bajos en pacientes con EM en comparación con los sujetos sanos. La deficiencia de vitamina D se considera un factor de riesgo para la EM (Munger y col., 2006; Mazdeh y col., 2013). Los estudios revisados se basan en el análisis de este riesgo determinando los niveles séricos de vitamina D o administrando esta vitamina a los pacientes para observar los posibles efectos beneficiosos (*Tabla 8*).

Varios estudios, como el de McDowell y col. (2010), sugieren que la contribución de esta vitamina a través de la dieta está condicionada por la temporada de nacimiento y la exposición al sol en la infancia y la adolescencia. Un estudio señala el poder protector de la leche. El riesgo de EM en la descendencia disminuye cuando la embarazada consume 2-3 vasos de leche por día (Mirzaei y col., 2011); aunque, el estudio de Munger y col. (2011) concluye que la ingesta de leche entera, importante fuente de vitamina D, aumenta el riesgo de EM.

La influencia del nivel de vitamina D en la dieta se asocia con una importante actividad clínica de la enfermedad (recaídas, fatiga, discapacidad) (van der Mei y col., 2007; McDowell et al., 2010), ya que las concentraciones observadas son más bajas en los brotes que durante la remisión, en el 70% de los pacientes con EM (Soilu-Hanninen y col., 2005). Aunque, Langer-Gould y col. (2011), en un estudio realizado en la etapa fisiológica de embarazo y postparto,

mostró que los niveles bajos de vitamina D en este periodo no se asocian con un mayor riesgo de brotes de EM en el postparto.

La EM es una posible causa de osteoporosis secundaria, y existe consenso en la bibliografía sobre la suplementación de vitamina D para la prevención y tratamiento de este problema. Cuando los pacientes con EM reciben altas dosis de vitamina D, como tratamiento para su enfermedad (Smolders y col., 2010), puede observarse su importante papel en el mantenimiento de la salud ósea al preservar la homeostasis del calcio y el fósforo (van der Mei y col., 2007; Steffensen y col., 2011; Toghianifar y col., 2015). Las dosis utilizadas de vitamina D varían considerablemente entre los diferentes estudios revisados. Los resultados estaban en función del sistema de intervención: algunos de los estudios analizaron incrementos de la cantidad de vitamina D en sangre y encontraron correlación con crisis, remisión de brotes, fatiga, EDSS (Soilu-Hanninen y col., 2005; Wingerchuk y col., 2005; Kimball y col., 2007; Dörr y col., 2012; Kampman y col., 2012; Soilu-Hanninen y col., 2012); y otros analizaron las pruebas de imagen de resonancia magnética, buscando nuevas lesiones o progreso de las existentes (Soilu-Hanninen y col., 2005; Wingerchuk y col., 2005; Kimball y col., 2007; Dörr, y col., 2012; Soilu-Hannin y col., 2012). Otros artículos estudiaron la tolerancia a las altas dosis de vitamina D administradas o a la duración del tratamiento, no observando riesgos de hipercalcemia o hipercalciuria (Kimball y col., 2007; Smolders y col., 2010).

Kampman y col., (2012) sugieren un papel inmunomodulador de la vitamina D, combinada con fármacos como el interferón  $\beta$  (INF- $\beta$ ), en procesos relacionados con enfermedades del metabolismo oxidativo y la inflamación. La administración oral de la vitamina D mostró importantes efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores por su acción en la inhibición de las células CD4+ T, principales reguladoras del sistema inmune (Smolders y col., 2010). El restablecimiento de los niveles adecuados de vitamina D puede ser considerado como parte del tratamiento en EM por su papel regulador en el metabolismo oxidativo y antiinflamatorio (Soilu-Hanninen y col., 2005; van der Mei y col., 2007).

### 1.3.7. Otras vitaminas y antioxidantes

Además de la vitamina D, 7 estudios demostraron la influencia en EM de otras vitaminas y antioxidantes (*Tabla 7*). Estos trabajos buscan la asociación directa entre los niveles sanguíneos de estas vitaminas y la EM o diferencias significativas entre la ingesta dietética de alimentos ricos en vitaminas o su administración como complemento, con el desarrollo clínico de la enfermedad. 2 artículos se refieren a la vitamina A (Bitafaran y col., 2014; Saboor Yaraghi y col., 2015), 3 estudios muestran los efectos de la vitamina B12 (Kocer y col., 2009; Najafi y col., 2012; Moghaddasi y col., 2013) y 1 estudio observacional se refiere a la ingesta de alimentos ricos en vitaminas y antioxidantes (Hejazi y col., 2014). En este grupo se incluye un artículo sobre el coenzima ácido alfa lipoico, que sugiere los beneficios de los efectos en los perfiles de citoquinas por su papel antioxidante (Khalili et al., 2014).

El déficit de vitamina B12 se asocia a la EM, por su papel en la formación de la vaina de mielina, además que por su efecto inmunomodulador (Kocer y col., 2009). Varios estudios han demostrado que los niveles en plasma de vitamina B<sub>12</sub> y folato son inferiores en los enfermos de EMRR, en cambio, los de homocisteína (HC) están significativamente incrementados (Moghaddasi y col., 2013; Saka y col., 2012). Otros autores afirman que no hay correlación entre la deficiencia de vitamina B12 y la edad de comienzo de la enfermedad, su duración, tipos o discapacidad generada (McDowell, 2010).

Por otro lado, Bitarafan y col. (2015), ensayaron un tratamiento con vitamina A que mejoró la capacidad cognitiva y la discapacidad en las extremidades superiores del tronco, medidos en la escala, "Multiple Sclerosis Functional Composite" (MSFC), aunque no se obtuvo cambios en la escala EDSS que mide discapacidad neurológica. Otro ensayo clínico muestra los efectos de la vitamina A sobre la expresión genética de los moduladores negativos de la expresión de las células T, reguladoras de la autoinmunidad, y sugiere que un suplemento con vitamina A podría suponer un nuevo enfoque en la prevención y tratamiento de la EM (Saboor-Yaraghi y col., 2015).

Un ensayo clínico aleatorio doble ciego controlado realizado por Khalili y col. (2014) sugieren que el consumo de ácido lipoico en pacientes con EM mejora la capacidad antioxidante total, pero no afecta a otros marcadores de estrés oxidativo. Sin embargo, Hejazi y col. (2014) no detectaron diferencias significativas en los niveles séricos y la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes (vitamina C, A y folato) y vitamina D entre pacientes con EM y controles sanos.

Tras la revisión, se concluye que la terapia de EM no se puede asociar firmemente con una dieta particular, debido a la escasez de información sobre los efectos de la nutrición en esta enfermedad. Las conclusiones de los estudios, a veces son limitadas, debido al pequeño número de sujetos, y algunas veces los autores solo usan un cuestionario de ingesta de alimentos para determinar la ingesta. Incluso la prueba EDSS utilizada en la mayoría de los estudios no es precisa al determinar las tasas de discapacidad y recaída.

Si bien no existe evidencia científica que recomiende una dieta protocolizada, existen pruebas suficientes para sugerir el consumo de uno o más alimentos tales como pescado, dietas bajas en grasa y granos integrales, así como el uso de vitaminas o complementos dietéticos de ácidos grasos omega 3. Existe una cantidad limitada de datos sobre el efecto beneficioso de los carotenoides y polifenoles de los alimentos ricos en verduras en la enfermedad de la EM (Riccio y col., 2015). Estas moléculas bioactivas podrían tener efectos antiinflamatorios debido a sus propiedades antioxidantes y a las acciones contra el estrés oxidativo (Khalili y col., 2014). Sin embargo, hay pruebas suficientes para decir que la deficiencia de vitamina D en el suero es un factor de riesgo en la EM y, por tanto, un posible biomarcador de la misma (McDowell y col., 2010; Mirzaei y col., 2011). Además, otros estudios muestran una correlación negativa entre la concentración sérica de vitamina B12 y la puntuación EDSS. La vitamina B12 tiene funciones fundamentales en la función del SNC, especialmente la conversión mediada por metionina sintasa de homocisteína a metionina, que es esencial para la síntesis de ADN y ARN. Por lo tanto, la deficiencia de B12 puede conducir a un aumento en el nivel de homocisteína. Se necesita más investigación para determinar si el

tratamiento con suplementos de vitamina B12 mejora la progresión de la enfermedad.

Las dietas o terapias alternativas no pueden reemplazar el tratamiento convencional en estos pacientes, pero una intervención nutricional saludable es bien aceptada por personas con EM y puede mejorar su estado físico e inflamatorio. Los hallazgos de que componentes particulares de la dieta pueden influir en el grado de respuesta inflamatoria, dieron a conocer que una intervención nutricional apropiada puede mejorar el curso de la EM, y puede considerarse como un posible tratamiento complementario de la EM.

Las perspectivas futuras en la investigación de la EM deberían aclarar si hay o no beneficio de la ingesta de vitamina D desde una edad temprana para evaluar si la vitamina es un compuesto que modula la inmunidad y la enfermedad y debe considerarse parte del tratamiento clínico de la EM. También se debe estudiar la relación entre la EM y la vitamina A, los folatos y la vitamina B12 en la formación de mielina.

### **1.3.8. Antropometría, cuestionarios dietéticos y parámetros bioquímicos**

La malnutrición es el desequilibrio entre el aporte de nutrientes y las necesidades de estos (Salvá, 1998). La evaluación del estado nutricional en pacientes con enfermedades crónicas discapacitantes es necesaria para prevenir la malnutrición y disminuir la morbimortalidad (Solans y col., 1999).

Aunque numerosos estudios nos informan de problemas nutricionales asociados a la EM (Kamalian y col., 1975; Fantelli y col., 1978; Cook y col., 1978; Williams y col., 1988; Thomas y Wiles, 1999; Prosiegel y col., 2004; Pasquinelli y Solaro, 2008; Plow y col., 2012; Sorgun y col., 2014), no puede concluirse la prevalencia de la desnutrición en pacientes con EM. Por otro lado, hay estudios observacionales recientes que asocian la obesidad, medida como la elevación del IMC, en la infancia y juventud, y el riesgo de padecer EM (Mokry y col., 2016). Así

mismo, en los pacientes con enfermedades crónicas, la disfagia es comúnmente un factor que contribuye a la malnutrición (Pasquinelli y Solaro, 2008).

Todos los factores que condicionan la EM y las comorbilidades que les acompañan, unido a la dificultad para obtener los alimentos, su preparación, su ingesta, y el proceso fisiológico de la digestión y absorción de nutrientes, incrementan el riesgo nutricional de estos pacientes (Posner y col., 1993; Fishman, 1994).

Se utilizan distintos instrumentos para la valoración del riesgo nutricional, como el cuestionario “Conozca su salud nutricional” (CSSN); Mini Nutritional Assessment (MNA) (Rubestein y col., 2001); Malnutrition Universal Sreening Tool (MUST) (BAPEN 2003) o el Nutritional Risk Screening 2002 (NRS 2002) (Kondrup y col., 2003).

La evaluación puede complementarse con valoraciones antropométricas, estudio de los parámetros bioquímicos de los pacientes y cuestionarios dietéticos que informen del ajuste de la dieta a las recomendaciones dietéticas.

Las medidas antropométricas son muy empleadas en la determinación del estado nutricional de pacientes con enfermedades crónicas degenerativas, buscando relaciones entre los valores antropométricos y riesgo nutricional (Olde Rikkert y col., 2014). Los estudios sobre riesgo nutricional y categorías de desnutrición en estos pacientes utilizan el IMC, el cambio de peso, medidas antropométricas, y cuestionarios nutricionales, sin embargo, estos estudios no se ponen de acuerdo en el alcance de la desnutrición en pacientes de Parkinson, con prevalencias que varían entre 0% y 24% en malnutrición y de 3-60% en riesgo de malnutrición (Sheard y col., 2011).

#### 1.4. CALIDAD DE VIDA Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La EM representa la mayor causa de discapacidad en adultos jóvenes (Trapp y Nave, 2008) y es uno de los ejemplos más claros de enfermedad que afecta la autonomía personal, independencia y planificación vital a largo plazo del paciente. Además de la discapacidad que genera la enfermedad, el paciente se ve afectado por una serie de comorbilidades que condicionan su vida cotidiana, como son: dolor, depresión, ansiedad y fatiga (Williams y col., 2014; Fiest y col., 2015), que repercuten en su salud en general y en su calidad de vida (CV), siendo para ellos tan importante como el empeoramiento físico y la enfermedad en sí misma. Esta enfermedad afecta al funcionamiento neurológico con alteraciones motoras y sensoriales, problemas de esfínteres y disfunción sexual; a la función neuropsiquiátrica con deterioro cognitivo, trastorno del estado de ánimo, además de la movilidad (Rothwell, 1998).

Fomentar la CV y el bienestar psicológico de estos pacientes puede tener efectos, sobre todo a largo plazo, de mejora de su salud mental (Calandri y col., 2017). El manejo de los síntomas y la modificación del estilo de vida son importantes herramientas para mejorar la vida de los pacientes con EM (Coyle., 2016).

La OMS define la CV como “la percepción de un individuo de su posición en la vida en el contexto cultural y sistema de valores en que vive, en relación con sus objetivos, expectativas, normas y preocupaciones” (OMS, grupo WHOQOL 1994). Es un concepto amplio y subjetivo influido por la salud física del sujeto, estado psicológico, nivel de independencia, relaciones sociales, creencias personales y relación con su entorno.

El concepto de calidad de vida relacionada con la salud (CVRS) es un instrumento válido de medida de su CV muy utilizado en ciencias de la salud. La CVRS evalúa la repercusión de la enfermedad o estado de salud, su tratamiento y otros cuidados sanitarios en la dimensión social y personal del paciente, ayudando a realizar un seguimiento efectivo del estado global del paciente, por si fuese

necesario variar las pautas de intervención médicas, farmacológicas y de tratamiento (Badía y col., 2001, Brazier y col., 2004).

Durante muchos años la investigación de la EM se ha limitado a estudiar el deterioro, discapacidad y minusvalía de los pacientes, pero hoy, en la práctica clínica, se considera tan necesario el concepto CVRS como el conocimiento del deterioro y discapacidad en la carga total experimentada en la enfermedad (Guijarro-Castro y col., 2010) ya que la EM es una enfermedad con gran potencial para afectar negativamente a la CVRS.

Respecto a los factores que afectan a la CVRS, diversos estudios concluyen que el deterioro neurológico y la discapacidad física influyen moderadamente en la CVRS global. Sin embargo, otros factores como la fatiga y la depresión o el deterioro cognitivo influyen de manera más importante (Henriksson y col., 2001).

La depresión y la fatiga han sido identificadas como los principales factores determinantes del deterioro en la calidad de vida de los pacientes con EM, independiente del grado de discapacidad física (Amato y col., 2001; Ziemssen, 2009). Los trastornos del estado de ánimo, especialmente la depresión y la ansiedad son muy comunes en los pacientes con EM. La depresión muestra uno de los vínculos más fuertes con puntuaciones bajas en la CVRS y así se refleja en diferentes estudios (Minden y col., 1987; Provinciali y col., 1999).

La prevalencia de deterioro cognitivo en la EM se estima alrededor del 45-65 % y es una característica de todos los subtipos de la enfermedad (Bagert y col., 2002). Los pacientes con deterioro cognitivo tienen una mayor probabilidad de ser menos independientes en sus actividades profesionales y sociales, y por lo tanto, tienen un alto grado de dependencia (Rao y col., 1991). La mayoría de los estudios muestran claramente una asociación entre el deterioro cognitivo y la CVRS global. Por ejemplo, la incapacidad de ejecución y el deterioro de la memoria están relacionados con un empeoramiento de la CVRS, en particular de la dimensión física y mental del SF-36 (Cutajar y col., 2000).

Aunque las puntuaciones elevadas en la escala EDSS se correlacionan con peores puntuaciones en diversas escalas de CVRS (Brunet y col., 1996), también es posible observar que los pacientes expresan una peor CVRS (Nortvedt y col., 1999) en estadios más precoces de la enfermedad, donde las puntuaciones de la EDSS son bajas. Esto es debido a que el paciente, al comienzo de la enfermedad, está más afectado por los factores emocionales derivados del impacto producido por el diagnóstico (Janssens y col., 2003).

Respecto al tipo de EM, resalta que la EM primaria progresiva tiene un impacto más negativo que la EM secundaria-progresiva, que a su vez supone un mayor deterioro en la CVRS que la EM remitente-recurrente (Pfenning y col., 1999).

La primera valoración de la CVRS en pacientes con EM fue publicada en 1992, evidenciando la menor CVRS en estos pacientes frente a enfermos de otras patologías (Rudick y col., 1996).

La valoración de la CVRS es necesaria para conocer y alertar a los profesionales de la salud de las necesidades no cubiertas de los pacientes de EM. Este conocimiento ayuda a desarrollar intervenciones tanto en el aspecto psicológico como físico que respondan a estas necesidades de los pacientes (Rosato y col., 2015). Además de las medidas clínicas de la progresión de la enfermedad y la discapacidad debería evaluarse la CVRS para mejorar las intervenciones y los tratamientos. (Williams y col., 2014).

Actualmente existe un gran interés en la comprensión de los factores predictivos de la CVRS, que permitan incorporar nuevas terapias no farmacológicas relacionadas con cambios en el estilo de vida con efectos positivos en la gestión de la enfermedad (Hadgkiss y col., 2013).

En los últimos 20 años se han desarrollado numerosos instrumentos y cuestionarios útiles para determinar con mayor precisión el impacto global de la

EM en la CVRS. Estos instrumentos utilizados para su determinación se clasifican en genéricos y específicos.

Se han diseñado escalas específicas para preguntar por síntomas concretos de la EM y detectar los cambios propios de la enfermedad. En las últimas décadas se han validado y desarrollado más de 20 escalas específicas para medir la CVRS en EM (Guijarro-Castro y col., 2010). En cada uno de ellas se incluyen funciones globales y/o específicas y se obtiene una puntuación que nos permite apreciar si hay buena o poca CV percibida.

#### **1.4.1. Cuestionarios genéricos para la valoración de calidad de vida**

Las escalas genéricas como las SF-36 (Short Form) y EuroQoL-5D, se utilizan para valorar cualquier enfermedad crónica, siendo útiles para comparar la percepción de la misma entre distintas patologías y situaciones.

El **cuestionario SF-36** determina un perfil de salud bidimensional, física y mental. Es el instrumento más utilizado para medir la CVRS (Ware y Sherbourne, 1992) y ha sido validado para pacientes con EM (Murrell, 1999; Pfennings y col., 1999). Es un cuestionario autoadministrado, en entrevistas personales o telefónicas (15') que da una medida amplia del impacto de la enfermedad y tiene en cuenta diversas dimensiones de la salud y permite comparar con la población sana, otras enfermedades, diferentes tipos de intervenciones o distintos estudios.

Consta de escalas multi-item para medir ocho dimensiones (función física, rol físico, dolor corporal, salud general, vitalidad, función social, rol emocional y salud mental) puntuadas de 0 (lo peor) a 100 (lo mejor) de la calidad de vida que se recogen en el SF-36.

Las puntuaciones obtenidas con el SF-36 son más bajas en pacientes con EM que en la población general y parece sobreestimar la salud mental en estos enfermos que tienen alta prevalencia de trastornos emocionales y cognitivos (Nortvedt y col., 1999).

El **EuroQol 5D (EQ-5D)** es un instrumento de medición de la CVRS de uso tanto en población general como en pacientes con diferentes patologías (Brooks, 1996) de fácil administración y validez internacionalmente probada (Herdman y col., 2001). Muy útil para valorar la CVRS en numerosas patologías neurodegenerativas (Martínez-Martin y col., 2011; Hechtner y col., 2014), entre ellas la EM. La CV, medida con el EQ-5D, de los pacientes con EM es significativamente peor en aquellos cuya enfermedad cursa con fatiga y depresión (Łabuz-Roszak y col., 2013) y se deteriora proporcionalmente a la duración de la enfermedad (Algahtani y col., 2017). Además, el EQ-5D es útil, de modo indirecto, para realizar análisis de coste-efectividad de los tratamientos de primera línea modificadores de enfermedad para brotes (Soini y col., 2017), y para medir efectos beneficiosos de medicamentos sobre síntomas, como depresión, capacidad de caminar, nivel cognitivo, fatiga, etc. (Korsen y col., 2017).

#### **1.4.2. Cuestionario específico para la valoración de calidad de vida**

Hay diferentes escalas específicas validadas para evaluar la CVRS en la EM: Hamburg Quality of Life Questionnaire (HAQUAMS); Multiple Sclerosis International Quality of Life (MUSIQOL); Multiple Sclerosis International Quality of Life Scale; Multiple Sclerosis Quality Of Life Questionnaire (MSQOL54), etc.

También se utiliza la Kurtzek Expanded Disability Status Scale (EDSS), instrumento usado por neurólogos para evaluar la severidad de la discapacidad en la EM, ya que esta se correlaciona de forma muy estrecha con descensos de la CVRS (Guijarro-Castro., 2010).

El Multiple Sclerosis Quality of Life 54 (MSQQOL-54) (Vickrey y col., 1995) fue el primer cuestionario científico validado para medir la CVRS en EM. Ha sido ampliamente utilizado tanto en la práctica clínica como en la investigación internacional.

El MSQOL-54 es mejor que los cuestionarios genéricos para medir cambios en la CVRS de los pacientes con EM (Ozakbas y col., 2007) y presenta ventajas

frente a otros cuestionarios específicos como son la comprensión, sencillez y rapidez de administración, que pueden evitar la posibilidad de tasa de respuesta baja. Además, puede ser utilizado para comparar la CVRS con otras enfermedades, así como con la población general, debido a que contiene el instrumento de valoración genérica, SF-36.

Actualmente, el MSQOL-54 es el cuestionario de evaluación de la CVRS más utilizado en los pacientes con EM (Nortvedt y Riise, 2003) y son numerosos los estudios que lo han empleado (Alshubaili y col., 2007; Heiskanen y col., 2007; Kargarfard y col., 2012; Fiest y col., 2017; Zamani y col., 2017; Kistic Tepavcevic y col., 2017; Baker y col., 2018; Barry y col., 2018).

Los pacientes con EM que estaban deprimidos obtuvieron peores puntuaciones en los conceptos de energía, salud mental, función cognitiva, función sexual y rol emocional que aquellos pacientes que no sufrían depresión (Wang y col., 2000). En otro artículo donde se empleó el MSQOL-54, se encontró una fuerte correlación inversa entre la CVRS global, tanto física como mental, y los síntomas depresivos (Amato y col., 1999).

#### **1.4.3. Valoración de la independencia en las actividades básicas de la vida diaria**

Para valorar la capacidad funcional en las actividades de la vida diaria (AVD) se pueden utilizar dos cuestionarios: el índice de Barthel (Mahoney y Barthel, 1965) y el índice de Katz (Katz y col., 1963). Son herramientas de demostrada validez y fiabilidad, fáciles de aplicar e interpretar y muy utilizadas en la práctica clínica y en investigación (Collin, 1988; Shah y col., 1989).

##### **1.4.3.1. Índice de Barthel (IB)**

El IB valora la independencia del paciente con respecto a su capacidad de realizar 10 actividades básicas de la vida diaria. Esta prueba comenzó a utilizarse en 1955 para estimar la discapacidad física, dando una medida de la capacidad

funcional y nivel de dependencia, en relación a actividades básicas de la vida diaria, de enfermos crónicos con trastornos neuromusculares y musculoesqueléticos. El IB es una herramienta útil para valorar la evolución de pacientes en los programas de rehabilitación (Mahoney y col., 1958; Mahoney y Barthel, 1965).

Es un instrumento sencillo, fácil de aprender e interpretar y que puede ser repetido periódicamente con bajo coste. Puede aplicarse tanto por profesionales sanitarios como por entrevistadores no sanitarios requiriendo una única sesión de aproximadamente una hora para aprender su manejo.

El IB se ha utilizado para medir las modificaciones de la capacidad funcional en pacientes con trastornos neurológicos como Parkinson (Macleod y Counsell, 2016; Uchino y col., 2017; Jung y col., 2017), Alzheimer (Li y col., 2017); ataxia cerebelosa (Nakamura y col., 2017), también en EM (Kubsik y col., 2016; Winser y col., 2016; Ottonello y col., 2017; Pompa y col., 2017).

#### **1.4.3.2. Índice de Katz (IK)**

Es un instrumento de valoración de la independencia de un enfermo para realizar las AVD creado en el año 1958 por un equipo multidisciplinar dirigido por S. Katz y formado por enfermeras, médicos, asistentes sociales, terapeutas ocupacionales y fisioterapeutas del hospital geriátrico The Benjamín Rose Hospital, para delimitar la dependencia en fracturas de cadera. Fue publicado un año después con el título de Index of Independence in Activities of Daily Living y en 1963 se publicó el artículo que demuestra la base teórica del índice y a cuyo autor debe su nombre (Katz y col., 1963).

Diseñado como un índice de rehabilitación hoy se emplea para la valoración de muchas enfermedades crónicas, siendo la escala más utilizada a nivel geriátrico y paliativo. En enfermedades neurodegenerativas ha sido aplicado en pacientes con Alzheimer (Hill y col., 2006; Handels y col., 2013).

El IK, posee buena consistencia interna, validez y reproductibilidad y junto con el de Barthel, es uno de los más utilizados (Valderrama y Pérez, 1997). Se ha utilizado en EM para determinar el impacto de la enfermedad (Einarsson y col., 2006; Ytterberg y col., 2008; Kierkegaard y col., 2017).

#### **1.4.4. Valoración del equilibrio y marcha: Test de Tinetti**

Las alteraciones motoras con problemas de la marcha son muy frecuentes en las personas con EM (40 %) ocurriendo en una etapa relativamente temprana de la enfermedad, acentuándose conforme avanza y con gran impacto en la vida de los pacientes (Fernández y col., 2005).

La EM incrementa los niveles de fatiga pudiendo llegar a ser invalidante obligando en muchos casos al paciente a interrumpir sus AVD y afecta al equilibrio aumentando el riesgo de caídas (Gervasoni y col., 2012). El paciente pierde fuerza en uno o más miembros, arrastra uno o dos pies al caminar y presenta fatiga acusada tras pequeños esfuerzos. Los factores implicados en los trastornos de la marcha en EM son diversos: espasticidad, ataxia, debilidad muscular, fatiga, trastornos visuales, problemas de sueño, ansiedad y depresión entre otros (Cattaneo y col., 2002; Prosperini y col., 2011).

La escala EDSS utilizada como medida clínica de la discapacidad no es capaz de detectar cambios en la evolución de la marcha (Goodkin, 1991; Hobart y col., 2000) y para medir la movilidad se han desarrollado distintos instrumentos como: la prueba para caminar 25 pasos o Timed 25 Foot Walk (T25W); prueba de los 6 minutos o Six minute Walk Test (TC6) y escala de la marcha en EM o 12 Item MS Walking Scale (MSWS-12), entre otras. No hay muchos estudios que evalúen la prevalencia y el impacto de caídas en pacientes de EM ni sobre intervenciones para minimizar ese riesgo. La escala más utilizada para la evaluación de la marcha y el equilibrio es la de Tinetti (Tinetti y col., 1986). Descrita en 1986 para determinar problemas de marcha y equilibrio y el riesgo de caídas en ancianos, valora, mediante observación directa, una serie de actividades y tareas que se le solicita realizar al paciente. La integran dos subescalas que miden equilibrio y

marcha y cuya suma dará una puntuación global que nos informa del riesgo de caídas.



## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar la influencia de la ingestión de infusiones de azafrán en una población de enfermos de EM, con el fin de observar una mejora en su estado nutricional y en su calidad de vida.

Para conseguir este objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Optimización y puesta a punto de la infusión de azafrán.
2. Evaluación de la influencia de la ingesta de infusión de azafrán sobre el estado nutricional a nivel de:
  - parámetros bioquímicos,
  - técnicas antropométricas,
  - ingesta dietética mediante el Cuestionario Frecuencia de Consumo, Recuerdo 24 horas y Conozca Su Salud Nutricional.
3. Evaluación de la influencia de la ingesta de infusión de azafrán en la calidad de vida relacionada con la salud, mediante:
  - cuestionario genérico EuroQol-5D y específico de la enfermedad MSQol-54,
  - nivel de dependencia y deterioro de la funcionalidad según los índices de Katz y Barthel,
  - valoración del equilibrio y la marcha con el Test de Tinetti.





### ***3. MATERIALES Y MÉTODOS***



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. AZAFRÁN

##### 3.1.1. Especia, materiales y equipos analíticos del azafrán

###### *Materia prima*

El azafrán utilizado fue Azafrán especia español (*Crocus. sativus* L.) con denominación de origen “Azafrán de La Mancha” de la cosecha de 2013, “La Molineta” (Minaya, España), de la empresa Agrícola Técnica de Manipulación y Comercialización S.L. Se eligió esta empresa por ser la que obtuvo en 2013 el Premio Gran Selección de Alimentos de Castilla La Mancha, categoría “Azafrán de La Mancha”.

###### *Equipos y reactivos*

- ✓ Agua destilada para limpieza
- ✓ Agua Milli-Q, obtenida usando un sistema de purificación (Millipore, Bedford, MA)
- ✓ Acetonitrilo obtenido de Pareac (Barcelona, Spain)
- ✓ Material de vidrio de uso habitual
- ✓ Espátulas metálicas
- ✓ Jeringas de polietileno (10 y 2 mL)
- ✓ Filtros de jeringa de politetrafluoroetileno (PTFE) 0.45µm, diámetro 13 mm (Millipore)
- ✓ Pipetas Pasteur de vidrio
- ✓ Puntas de pipeta de distintos volúmenes (5 mL, 1mL, 500 µL)
- ✓ Cronómetro

- ✓ Placas agitadoras (Selecta)
- ✓ Balanza analítica ST, máx. 160g y d: 0.0001 (Gram Precision)
- ✓ Halogen lamp moisture balance model XM-120T (Cobos, Barcelona, Spain)
- ✓ Espectrofotómetro Lambda 25 UV-Vis (Perkim Elmer).
- ✓ Cubetas de cuarzo de 1 mm, 2 mm y 10 mm de espesor
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent 1200 con detector diodo alineados (DAD) (Agilent G1315D). HPLC-DAD
- ✓ Trituradora de rodillos tamaño de partícula de 2 mm

### 3.1.2. Fundamento y metodología de análisis del azafrán

El azafrán se analiza mediante dos técnicas: espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).

#### ***Determinación de la calidad alimentaria del azafrán por Espectrofotometría UV-Vis***

La calidad del azafrán comercial se determinó siguiendo las especificaciones recomendadas por la norma de la Organización Internacional de Normalización para el azafrán (ISO 3632, partes 1 y 2, 2011). Esta norma determina la metodología de análisis del azafrán para su clasificación en tres diferentes categorías y es la empleada en casi todas las transacciones comerciales internacionales.

Con la determinación de la calidad alimentaria del azafrán obtendremos la categoría del azafrán utilizado, si bien el azafrán comprado fue Azafrán DOP “Azafrán de La Mancha”, con un pliego de condiciones más exigente que el requerido por la propia Norma ISO.

La norma ISO 3632 (2011) permite la determinación de las principales características del azafrán ligadas con el contenido en picrocrocina, safranal y crocinas. Es directamente aplicable al azafrán en polvo y en hebra.

Mediante espectrofotometría UV-vis se mide la variación en la densidad óptica entre 190 nm y 700 nm de un extracto acuoso de azafrán a temperatura ambiente. Los parámetros determinados son el  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  a 440 nm que es el poder colorante, el  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  a 330 nm, poder aromático y el  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  a 257 nm, poder amargo (*Tabla 9*).

Los máximos de absorbancias a esas longitudes de onda se corresponden con los máximos de absorción de las crocinas (440 nm), safranal (330) y picrocrocina (257 nm), principales componentes del azafrán. Pero es importante conocer que mientras la  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  a 440 nm está directamente relacionada con las crocinas, las  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  a 257 y  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  a 330 nm, no dan una medida exacta de safranal y picrocrocina, porque los isómeros *trans* y *cis* de las crocinas también se absorben 250 nm y los isómeros *cis*, sobre todo, absorben a 250 y 330 nm causando interferencias en las mediciones, como lo demuestran muchos trabajos (Tarantilis y col., 1994; Alonso y col., 1996; García-Rodríguez y col., 2014).

Tabla 9. Categorización del azafrán según su poder colorante, picrocrocina y safranal

Características	I	II	III	Método de análisis
Poder colorante (expresado como crocina) $E_{1\text{cm}}^{1\%} 440\text{nm}$	200	170	120	ISO 2011 Capítulo 13
Poder amargo (expresado como picrocrocina) $E_{1\text{cm}}^{1\%} 257 \text{ nm}$	70	55	40	ISO 2011 Capítulo 14
Poder aromático (expresado como safranal) $E_{1\text{cm}}^{1\%} 330\text{nm}$	mínimo 20 máximo 50			ISO 2011 Capítulo 15

La metodología siguió la Norma ISO 3632 (2011), pero disminuyendo la cantidad a muestrear a 50 mg de azafrán. Previamente se determina la humedad de la muestra, utilizando una lámpara de desecación halógena, hasta llegar a peso constante. Se obtiene la masa del residuo desecado y aplicando la fórmula se calcula la humedad, expresada como porcentaje de la muestra inicial, donde  $m_0$  y  $m_4$  son las masas en gramos de la porción para análisis y del residuo desecado, respectivamente.

$$h = (m_0 - m_4) \times \frac{100}{m_0}$$

La muestra se preparada pesando 50 mg de azafrán, con una aproximación de 0,001 g, previamente pasado por un filtro con un diámetro de 0,5 mm, se transfirió a un matraz aforado de 100 ml, se añadió 90 ml de agua Mili-Q. La solución se somete a agitación, utilizando un agitador magnético, en ausencia de luz, durante 1 h. El matraz se enrasa hasta 100 ml y la solución se homogeneiza mediante agitación. La solución se filtra

haciéndola pasar por un filtro PTFE, con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Figura 22).

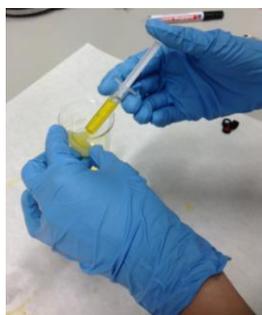


Figura 22. Filtrado de la solución a través de un filtro PTFE, con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$

De esta dilución (1:2000 masa-volumen) se tomó una alícuota para la espectrofotometría UV-Vis y se reservó otra alícuota para la determinación posterior por el método HPLC-DAD. Se realizó el espectro de absorbancia entre 190 y 700 nm de los extractos acuosos usando como referencia agua destilada.

Los resultados de absorbancias a 257, 330 y 440 nm obtenidos se utilizaron para evaluar el poder aromático, poder amargo y poder colorante respectivamente, mediante la siguiente fórmula, donde  $D$  es la absorbancia específica,  $m$  la masa del azafrán, expresada en gramos y  $h$  es la humedad y contenidos volátiles de la muestra, expresada como fracción de masa.

$$E_{1\text{cm}}^{1\%nm} = \frac{D \times 10000}{m(100 - h)}$$

El espectro UV-Vis no diferencia las absorciones entre las formas cis y trans de las crocinas, aspecto de gran importancia desde el punto de vista terapéutico del azafrán. Por ello se precisó el método de cromatografía líquida de alta resolución HPLC-DAD, para identificar y cuantificar las crocinas, picrocrocina y safranal y determinar sus concentraciones de forma precisa.

### **Identificación y cuantificación de los principales compuestos bioactivos del azafrán por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD)**

El espectro UV-Vis no diferencia las absorciones entre las formas *cis* y *trans* de las crocinas, aspecto de gran importancia desde el punto de vista terapéutico del azafrán. Por ello se precisó el método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos alineados (HPLC-DAD), para identificar y cuantificar las crocinas, picrocrocina y safranal y determinar sus concentraciones de forma precisa.



Figura 23. Preparación de las muestras de 20  $\mu$ L del extracto acuoso para su inyección en el equipo de HPLC-DAD

20  $\mu$ l de la muestra del extracto acuoso obtenidas según el método ISO 3632 (2011) (Figura 23), descrito anteriormente, se inyectaron en el cromatógrafo operando con una columna de 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m Phenomenex a una temperatura de 30 °C. Los eluyentes utilizados fueron agua (A) y acetonitrilo (B) con los gradientes siguientes: 20% B, 0-5 min; 20-80%, 5-15 min; y 80% B, 15-20 min. La velocidad de flujo de elución fue de 0,8 mL. El detector DAD realizó lecturas a 250, 330 y 440 nm para picrocrocina, safranal y crocinas, respectivamente. Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

Se seleccionaron las áreas de cada una de las sustancias a partir de los tiempos de retención y su espectro. La cuantificación se realizó a partir de rectas de calibrado (García-Rodríguez y col., 2014), incluyendo las áreas

obtenidas, obteniendo los porcentajes de cada una de las sustancias bioactivas, expresados en mg/100 mg de azafrán.

Tabla 10. Parámetros de las rectas de calibrado para cada uno de los compuestos analizados del azafrán. El parámetro *a* representa la pendiente y el *b* la ordenada en el origen

<b>Principios bioactivos</b>	<b><i>a</i></b>	<b><i>b</i></b>
<i>Picrocrocina</i>	0,0290	0,5194
<i>Safranal</i>	0,0323	0,0510
<i>Trans-5-tG</i>	0,0075	0,0080
<i>Trans-4-GG</i>	0,0075	0,0080
<i>Trans-4-ng</i>	0,0075	0,0080
<i>Trans-3-Gg</i>	0,0071	0,0047
<i>Tran-2-gg</i>	0,0071	0,0047
<i>Cis-4-GG</i>	0,0053	0,0057
<i>Trans-2-G</i>	0,0071	0,0047
<i>Cis-3-Gg</i>	0,0051	0,0033
<i>Cis-2-gg</i>	0,0051	0,0033
<i>Cis-2-G</i>	0,0051	0,0033

### 3.1.3. Preparación de las infusiones del azafrán especia

Se considera que el azafrán tiene mayor calidad cuanto mayor es la concentración de sus tres componentes bioactivos mayoritarios: crocinas, safranal y picrocrocina, por este motivo se adquirió el azafrán con Denominación de Origen Protegida, DOP: “Azafrán de La Mancha”, dentro de estos el que había obtenido el “Premio Gran Selección” de alimentos de Castilla-La Mancha en la última campaña que fue a la empresa Agrícola Técnica de Manipulación y Comercialización S.L. (“La Molineta”, Minaya, España).

Para obtener la mejor infusión posible se siguió el siguiente proceso: estudio de la concentración óptima de azafrán en la infusión; estudio cinético de extracción de los metabolitos principales en tres formatos (hebra, triturado y molido); determinación del tiempo de extracción para la

preparación de la infusión; envasado del azafrán y determinación de la calidad del azafrán y de los compuestos bioactivos del azafrán durante el tiempo de ingestión.

#### ***Estudio teórico de la concentración óptima de azafrán en la infusión***

La concentración óptima de especia a utilizar en la preparación de las infusiones se decidió tras realizar una revisión bibliográfica de intervenciones alimentarias de azafrán en humanos. La búsqueda se realizó en bases de datos PubMed, Scopus y SciFinder. Los ensayos clínicos se recogieron de los buscadores Embase, ClinicalTrials y OpenGrey. Los descriptores utilizados fueron: "clinical trials AND saffron", "dosis saffron" y "toxicity saffron". Así se decidió la dosificación de la especia partiendo de condiciones de seguridad y eficacia.

#### ***Estudio cinético del azafrán: Determinación del formato de azafrán y el tiempo de extracción***

La mejor forma de preparar las infusiones del azafrán especia y sus condiciones óptimas de ingesta se obtuvieron del estudio cinético de extracción de sus componentes. Esto permitió ajustar el tiempo de reposo de la infusión antes de la ingestión y decidir tamaño de partícula de la materia vegetal.

Se ensayaron tres formatos posibles para la preparación de la infusión: azafrán en hebra, triturado o molido. La muestra molida se obtuvo a partir de azafrán en formato hebra mediante la molienda siguiendo la Norma ISO 3632 (2012). Se tamizó la muestra de azafrán usando un tamaño de malla de 0,5 mm y haciendo pasar el 95% del polvo a través de éste. Después, se reincorporó la muestra retenida en el tamiz, y se homogeneizó el total de la muestra reconstituida. La muestra triturada se obtuvo a partir del azafrán hebra utilizando un triturador doméstico, dejando un tamaño de partícula intermedio entre el azafrán en hebra y el azafrán molido.

Para la preparación de la infusión se pesaron 50 mg de azafrán (hebra, triturado y molido) y se adicionaron a 200 ml de agua mineral calentada hasta ebullición (simulando condiciones de consumidor para la infusión). Se obtuvieron muestras para evaluar el grado de extracción en los minutos 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13 y 15 (*Figura 24*), tomando una alícuota de 10 ml, para los distintos ensayos, manteniendo agitación ocasional para su homogeneización. Se cuidó no recoger parte sólida. Se controló las temperaturas a los tiempos de extracción de la alícuota.

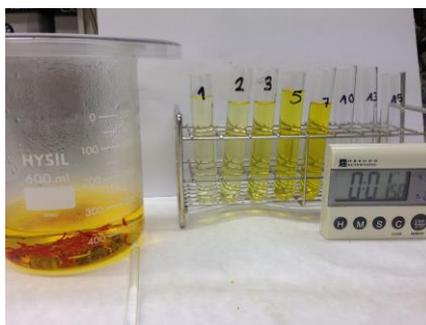


Figura 24. Evaluación del grado de extracción a lo largo del tiempo

Las muestras recogidas de infusión, preparadas según se describe en el punto 1.2, se llevaron a la lectura por espectrofotometría UV-Vis, efectuando un barrido de 190 a 700 nm, utilizando como referencia agua destilada y en cubetas de cuarzo de 1cm, a 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13 y 15 minutos. Así mismo con las alícuotas obtenidas a los distintos tiempos, según el método descrito se procedió a la lectura y obtención de resultados por HPLC-DAD. Así se pudo corroborar los datos obtenidos mediante espectrofotometría UV-Vis y obtener mayor conocimiento de los resultados sobre el tiempo de reposo para obtener la máxima extracción de compuestos bioactivos en las infusiones de azafrán.

#### 3.1.4. Envasado del azafrán

El azafrán fue adquirido a la empresa “La Molineta” Agrícola Técnica de Manipulación y Comercialización S.L. (Minaya, España). Posteriormente fue envasado, para su mejor dosificación y conservación, en sobres monodosis

acondicionados para proteger al azafrán de la luz y humedad, por la empresa Verdú-Cantó (Villena, España).

A los pacientes se les suministró el azafrán en cajas, conteniendo el número de sobres exacto para la duración de la intervención.

### **3.1.5. Determinación de la estabilidad de los compuestos a lo largo del estudio**

A lo largo del tiempo que duró el estudio se comprobó la calidad alimentaria del azafrán suministrado a los pacientes mediante espectrofotometría UV-Vis y se cuantificó la estabilidad de la composición de compuestos bioactivos por cromatografía líquida de alta resolución con diodos alineados (HPLC-DAD). Para ello se realizaron tres controles de calidad y determinación de las sustancias a las que se atribuye actividad: al inicio (primer control), a los 45 días (segundo control) y tras finalizada la toma del azafrán, a los 93 días (tercer control).

Los análisis se realizaron sobre las muestras procedentes de tres cajas elegidas al azar, numeradas como 1:1, 1:2 y 1:3. De cada una de las cajas se tomaron 2 sobres, obteniéndose así 6 muestras. Cada una de estas muestras se analizó por duplicado.

A partir de las áreas del cromatograma que separa, identifica y cuantifica los diferentes componentes, se obtuvieron las concentraciones de compuestos bioactivos del azafrán, expresadas en porcentaje (mg/100mg de azafrán) de picrocrocina, safranal, y la suma de las 10 crocinas más abundantes.

Se siguió este procedimiento en los tres controles realizados a lo largo del estudio.

### **3.1.6. Tratamiento de datos**

Los datos fueron procesados mediante el programa informático Microsoft Office Excel para la obtención de las cinéticas a partir de los resultados obtenidos mediante espectrofotometría UV-Vis y HPLC-DAD.

## **3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

El estudio es una intervención nutricional de tipo descriptivo y longitudinal con enfermos de EM en las poblaciones de Albacete y Almería entre los años 2013 y 2014.

Esta tesis ha podido ser realizada contando con la colaboración de la Asociación Española de Esclerosis Múltiple en Albacete (ADEM-AB) o Centro Integral de Enfermedades Neurológicas (CIEN) con dirección en Calle Ciudad Real, 24, Bajo, 02002 - Albacete y la Asociación de Esclerosis Múltiple de Almería (AEMA), con dirección en Calle Chafarinas Nº3, 04002 - Almería.

La intervención nutricional con la toma de la infusión se realizó durante 93 días. La recogida de datos se realizó en los locales de las Asociaciones en varias sesiones, antes de la intervención e inmediatamente después a la finalización de la misma.

### **3.2.1. Selección de la población**

#### ***Criterios de inclusión***

- ✓ Hombres y mujeres, mayores de 18 años, diagnosticados de EM tomando como referencia los criterios diagnósticos de McDonald.
- ✓ Con brotes o remisiones o con EM progresiva secundaria y en situación de estado ambulatorio, no hospitalizados, que caminen sin asistencia, y que la duración de su enfermedad no sea superior a 10 años.

- ✓ Con una puntuación en la escala Expanded Disability Status Scale (EDSS) menor o igual a 6,5.

### **Criterios de exclusión**

- ✓ Pacientes diagnosticados de EM con una puntuación en la escala Expanded Disability Status Scale (EDSS) mayor a 6,5.
- ✓ Aquellos que manifestaron tener algún tipo de intolerancia alimentaria.
- ✓ Embarazadas.

### **3.2.2. Planificación del estudio**

El **reclutamiento de población** de enfermos de EM para el estudio comenzó con una fase de información a los pacientes de las condiciones del estudio: objetivo, condiciones, procedimientos y el tiempo previsto para su realización.

Se realizó la **exposición del proyecto** a los posibles participantes en los locales de las Asociaciones de las dos provincias: Asociación de Esclerosis Múltiple de Almería (AEMA) y Centro Integral de Enfermedades Neurológicas (CIEN) de Albacete. Además, se explicó a los asistentes, mediante una charla informativa, la importancia de una alimentación adecuada en una enfermedad crónica degenerativa.

El estudio fue aprobado por la **Comisión de Ética de Investigación** de la Universidad de Murcia con informe favorable.

Se procedió a la **selección de pacientes** de las 2 Asociaciones de Esclerosis Múltiple (Albacete y Almería) entre los que cumplían los criterios de inclusión para entrar a formar parte del presente estudio. Mediante una reunión con los neurólogos de las asociaciones se revisó la historia clínica y el valor del EDSS de las personas interesadas que podrían incorporarse al

estudio y se comprobó el cumplimiento de los criterios de inclusión previamente establecidos.

Los pacientes seleccionados y que decidieron participar en el estudio de manera voluntaria, firmaron el **Consentimiento Informado**, modelo recogido en el Anexo I, de acuerdo al Comité de Ética de la Universidad de Murcia con el fin de aplicar el Principio de Autonomía de los pacientes.

Se determinó el **grado de discapacidad** de cada uno de los voluntarios por un médico especialista en neurología, de acuerdo al procedimiento (RD 1971/1999). Todos los pacientes seleccionados fueron valorados en los 6 meses anteriores al inicio del estudio.

Se sometió a los pacientes a una **sesión de instrucción** donde se les informó sobre:

- ✓ Cómo preparar la infusión de azafrán y realizar su ingesta.
- ✓ Días de las citas en el centro de la Asociación para las entrevistas y pruebas previas al inicio de la toma y posteriores. Explicación del desarrollo del test físico que se les realizaría, previa cita, también en las sedes de la Asociación.
- ✓ Se les informó que una vez procesados los datos se les trasladaría una copia de los informes individuales a los neurólogos de las Asociaciones a efectos de que estos les transmitieran los resultados.
- ✓ Se les instruyó para la cumplimentación de los cuestionarios dietéticos autoadministrados y de los plazos máximos para su entrega.

En la **entrevista basal** se recogieron los cuestionarios y realizaron las mediciones antropométricas de los pacientes.

Tras la ingesta del azafrán se realizó la **entrevista final** con recogida de datos mediante cuestionarios y medidas de valores antropométricos.

Finalizada la toma de azafrán el neurólogo realizó una **nueva valoración del EDSS** para la nueva evaluación de la enfermedad y para detección de los posibles cambios en los niveles indicadores de mejoras.

### **3.3. MEDIDAS DEL ESTADO NUTRICIONAL**

Describir el estado nutricional es necesario para valorar la necesidad de desarrollar recomendaciones dietéticas específicas a estos pacientes.

Se elaboró un cuaderno de recogida de datos que incluyó varios cuestionarios para valorar las características sociodemográficas, los parámetros bioquímicos y antropométricos y la ingesta dietética

#### **3.3.1. Parámetros bioquímicos**

Los datos bioquímicos clásicos, el perfil lipídico y el perfil hepático, aportan información sobre posibles variaciones en algunos parámetros tras la ingestión del azafrán.

Se solicitó a los pacientes que se realizaran una analítica de suero sanguíneo en los hospitales de referencia donde estaban siendo tratados. Los informes de los resultados de las analíticas de sangre fueron facilitados por el paciente. Se recogieron las analíticas obtenidas días antes de comenzar el estudio y las posteriores a la administración del azafrán. Los parámetros hematológicos obtenidos fueron: glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, calcio, sodio, potasio, cloro e hierro. El perfil lipídico estaba constituido por colesterol, triglicéridos (TG) y dos lipoproteínas plasmáticas, LDL-colesterol y HDL-colesterol. Por último, para evaluar el perfil hepático se incluyó la fosfatasa alcalina, la GOT (glutamato-oxalacetato transaminasa), la GPT (glutamato-piruvato-transaminasa) y la GGT (gammaglutamiltranspeptidasa).

Los valores séricos normales dependen del método usado para su determinación, por ello pueden variar ligeramente entre diferentes

laboratorios. Se utilizaron los valores de referencia de los laboratorios donde se realizaron las analíticas. No se hizo diferenciación por género por tratarse de una muestra con un tamaño pequeño.

Para la interpretación de los datos y el contraste de las posibles variaciones atribuibles a la intervención nutricional se utilizaron los valores paramétricos de Prieto-Valtueña y Yuste-Ara, (2015).

### **3.3.2. Medidas antropométricas**

Se realizó a cada paciente un control de su estado nutricional mediante antropometría al inicio del estudio y al final. Las medidas antropométricas se efectúan con 2 antropometristas.

#### ***Equipos***

- ✓ Báscula portátil, modelo SECA bellísima 841 capacidad 200 Kg.
- ✓ Tallímetro, marca PSYMTEC modelo 601, largo total 2000 mm, 5 secciones.
- ✓ Lipocalibre, modelo HOLTAIN T/W SKINFOLD CALIPERS, Crymych U.K., precisión 0,2 mm.
- ✓ Pie de rey, modelo MITUTOYO vernier caliper 160-170 C20P.
- ✓ Equipo de bioimpedancia eléctrica. Analizador de bioimpedancia OMRON mod. BF 306.
- ✓ Cinta métrica inextensible marca LUFKIN.

Se toman las siguientes medidas corporales: peso, talla, diámetros biepicondilar y bicondilar; circunferencias del brazo, brazo flexionado, cintura, cadera y pierna; espesor de pliegues cutáneos tricipital, subescapular, supraespinal y pierna e impedancia.

### **Parámetros medidos**

Los parámetros medidos son los siguientes:

- ✓ *Talla*: Se realiza con el tallímetro, de 2 valvas. Para ello se busca mantener la horizontalidad de la cabeza, colocando al sujeto en posición erecta, conservando el plano de Frankfurt (de modo que la línea imaginaria trazada desde la parte inferior del orbital del ojo hasta la zona superior del meato auditivo sea horizontal) (Dudet, 2004).
- ✓ *Peso*: El paciente se sitúa recto con los brazos hacia abajo y desprovisto de cualquier objeto que pudiera causar errores en el resultado de la medida (Kuo y col., 2006).
- ✓ *Diámetros biepicondilar y bicondilar*: Se utiliza el pie de rey. Con el codo y rodilla flexionados, se palpan epicóndilos y cóndilos respectivamente y ajusta el calibre hasta que entre en contacto con el hueso (Martín-Moreno y col., 2001).
- ✓ *Circunferencias del brazo, brazo flexionado, cintura, cadera y pierna*: Se utiliza la cinta métrica inextensible. Para hallar la circunferencia del brazo se coloca la cinta métrica en el punto medio del brazo no dominante con el brazo relajado, caído y pegado al cuerpo. La circunferencia del brazo flexionado se calcula pidiendo al paciente que flexione el brazo y colocando la cinta métrica en la zona más prominente. Para medir la circunferencia de la cintura se localiza el punto medio entre la última costilla flotante y la cresta iliaca (Luchsinger y col. 2008, Festi y col. 2009) y para la cadera el punto más prominente de los glúteos. Para la medida de la pierna se localiza el punto medio de la pantorrilla (Becerra, 2006).
- ✓ *Espesor de los pliegues cutáneos tricipital, subescapular, supraespinal y de la pierna*: Se realiza la medida con el lipocalibre. Se mide el pliegue

tricipital en el punto medio del brazo no dominante con el brazo relajado y pegado al cuerpo. Para el pliegue cutáneo subescapular se localiza el punto inferior de la escápula y en posición diagonal se toma el pliegue. El supraespinal se encuentra sobre la cresta ilíaca y se toma el pliegue superior en un ángulo de 45°. El pliegue cutáneo de la pierna se localiza en el punto medio de la pantorrilla con el paciente sentado con las piernas en ángulo de 90° (Lohman y col., 1991).

- ✓ Impedancia: Se utilizó el Analizador de Bioimpedancia (B.I.A.). Con el valor de la bioimpedancia se obtiene el porcentaje de grasa corporal. El fundamento de este equipo se basa en la mayor o menor resistencia que ofrecen los distintos compartimentos corporales al paso de la corriente eléctrica, de modo que el compartimento adiposo se comporta como un componente aislante respecto al paso de este tipo de corriente eléctrica (Himes, 2009).

### ***Índices calculados***

Con los datos iniciales y finales obtenidos de los parámetros antropométricos, se calcularon una serie de índices: Índice de Masa Corporal (IMC) (Kg/m<sup>2</sup>), relación cintura/cadera, densidad corporal (tricipital + subescapular, tricipital, subescapular), superficie muscular brazo y masa muscular total en porcentaje y en kilogramos.

- ✓ ***Índice de Masa Corporal (IMC)***: Es un indicador del estado nutricional, calculado dividiendo el peso en kilogramos por la talla al cuadrado. El IMC es considerado normal en los valores comprendidos entre 20-24,9 (kg/m<sup>2</sup>), sobrepeso 25-29,9 (kg/m<sup>2</sup>) y obesidad 30-34,9 (kg/m<sup>2</sup>) (Katz y col., 2011).

- ✓ **Relación cintura/cadera:** Es el cociente de la medida de la cintura y la cadera en centímetros. Es el índice más frecuentemente utilizado para determinar la acumulación de grasa visceral (Corvalán y col., 2010).
- ✓ **Densidad corporal:** El porcentaje de grasa corporal se calcula a partir del espesor de los pliegues tricipital y subescapular y de ella se deduce la grasa corporal total aplicando la fórmula siguiente, donde c y m son constantes que varían en función del sexo y el tipo de pliegue medido (subescapular o tricipital) (Koleva y col., 2000).

$$\text{Densidad corporal (g/ml)} = c - m \times \log_{10} (\text{suma pliegues (mm)})$$

- ✓ **Superficie Muscular del Brazo (SMB):** Se calcula a partir de la circunferencia del brazo y del espesor del pliegue tricipital, introduciendo los datos en la fórmula siguiente, donde la constante (Cte) tiene un valor de 9,7 cm<sup>2</sup> en hombres y de 6,5 cm<sup>2</sup> en mujeres (Heymsfields, 2007).

$$\text{SMB (cm}^2\text{)} = \pi/4 (\text{CB (cm)}/\pi - \text{Espesor de pliegue tricipital (cm)})^2 - \text{Cte}$$

- ✓ **Masa muscular total (MMT):** Se puede expresar en valor absoluto en kilogramos o en forma de porcentaje partiendo de la SMB (Heymsfields, 2007).

$$\text{MMT (kg)} = \text{Talla (cm)} \times (0,024 + 0,0029 \times \text{SMB (cm}^2\text{)})$$

$$\text{MMT (\%)} = \text{MMT (kg)}/\text{Peso (kg)} \times 100$$

Los datos antropométricos se obtuvieron utilizando dos tipos de registro: básico y avanzado.

### 3.3.3. Cuestionarios de ingesta dietética

#### *Frecuencia de consumo de alimentos (CFC)*

Los pacientes respondieron al cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFC), método retrospectivo de estimación directa de la ingesta alimentaria que permitió establecer un perfil de dieta individual y el aporte calórico y nutricional.

El CFC se estructura en una lista de alimentos clara, concisa y organizada por grupos de alimentos. La persona entrevistada contestó al número de veces que había ingerido para cada ítem del cuestionario, diaria, semanal u ocasionalmente (1 vez mes). La información obtenida puede considerarse cualitativa y semicuantitativa ya que se añadió a cada alimento un tamaño o ración, considerando los valores estándar medios consumidos habitualmente por la población (Martín-Moreno y col., 2007). Se utilizaron los valores de "raciones de alimentos recomendadas para adultos" del documento de consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC, 2004).

El tratamiento de los datos fue procesado con el programa ADN 4.0, Alimentación, Dietética y Nutrición, programa diseñado por la Universidad Complutense para el análisis de dietas (García-Diz y col., 2009), construido en base a las tablas de composición de alimentos (Mataix y col., 2003), permitiendo comparar además las ingestas de nuestros pacientes con las ingestas diarias recomendadas (IDRs) (Moreiras y col., 2011).

Este cuestionario presenta algunas limitaciones como que los pacientes presenten patrones dietéticos muy diferentes a los considerados en el cuestionario. Además, al ser preguntado por los hábitos en el último año pueden producirse sesgos de memoria. También puede existir escasa precisión a la hora de estimar las porciones de alimentos (Martínez y col., 2010) Pero estas limitaciones pueden ser minimizadas si las respuestas se revisan por personal cualificado (Caan y col., 1999)

### ***Recuerdo 24 horas***

Junto al cuestionario de frecuencia de consumo se les entregó a todos los pacientes el recordatorio de 24 horas que es uno de los métodos más ampliamente utilizados para evaluar el consumo de alimentos y nutrientes en una población. Los pacientes contestaron esta encuesta en su domicilio, anotando todas las horas de las ingestas realizadas, lugar donde la realizó, tipo, volumen y técnica de elaboración del alimento o bebida y cantidad en gramos o centímetros cúbicos de cada uno de ellos. Indicaron también si la alimentación era en un día habitual o presentaba diferencias debido a estar enfermo u otra situación especial.

Los días observados fueron tres, siendo uno de ellos un festivo.

Una vez cumplimentado por el paciente, siguiendo las recomendaciones, lo entregaron al entrevistador. Los datos obtenidos fueron procesados en el programa ADN 4.0, Alimentación, Dietética y Nutrición, diseñado por la Universidad Complutense para el análisis de dietas (García-Diz y col., 2009).

### ***Conozca su Salud Nutricional (CSSN)***

El cuestionario “Conozca su Salud Nutricional”, en inglés, Nutritional Screening Initiative check list (NSI) nos permite detectar el estado de salud nutricional y valorar el riesgo nutricional

Consta de diez ítems de respuesta dicotómica, en relación al tipo y cantidad de alimentos que consume, frecuencia de la ingesta, limitaciones para la compra, preparación de la comida e ingesta de la misma, consumo de medicamentos y la ganancia o pérdida involuntaria de peso en el tiempo.

El resultado nos permite clasificar a los pacientes en tres niveles de riesgo nutricional: muy bajo, medio y alto. El riesgo nutricional muy bajo (0-2), aconseja reevaluar la situación en 6 meses; riesgo nutricional medio (3-5) que obliga a mejorar los hábitos de vida y a reevaluar en 3 meses y el riesgo

nutricional alto (6-21) que debe llevar al paciente a consultar con un especialista.

La información se gestionó en un programa informático específico en Visual Basic 6.0 ligado al cuestionario Conozca Su Salud Nutricional (CSSN) para su posterior desarrollo numérico detallada (Murcia y col., 2008).

### **3.4. MEDIDAD DE LA CALIDAD DE VIDA**

Para la recogida de la información necesaria para evaluar la calidad de vida relacionada con la salud (CVRS) se utilizaron dos instrumentos, uno genérico, el EuroQol-5D (EQ-5D) (Brooks, 1996), en su adaptación a la población española (Badía y col., 2001), que puede utilizarse tanto en población general como en grupos de pacientes con diferentes patologías y otro específico para enfermos de EM, Multiple Sclerosis Quality of Life 54 (MSQOL-54) (Vickrey and col., 1995).

Los dos cuestionarios se cumplimentaron por personal cualificado en las entrevistas realizadas a los enfermos de EM.

Por otro lado, se empleó el índice de Katz y el índice de Barthel para evaluar la capacidad funcional de los pacientes para realizar las actividades de la vida diaria. La obtención de la información fue verbal, interrogando directamente al paciente. Por último, se empleó el test de Tinetti que fue útil para evaluar la marcha y el equilibrio.

#### **3.4.1. Instrumento Europeo de Calidad de Vida (EQ-5D)**

El EuroQol-5 Dimensiones (EQ-5D) (EuroQoL Group, 1990) es una medida de salud utilizada en la práctica clínica o en la población general, sencilla, económica y de fácil y rápida aplicación (Lips y Van Schoor, 2005). El cuestionario estima numéricamente la CVRS sentida por el paciente el día en que se está realizando la entrevista.

En su adaptación a la población española (Badia y col., 2001) el cuestionario se divide en tres partes: la primera parte es un sistema descriptivo en cinco dimensiones de salud (movilidad, cuidado personal, actividades cotidianas, dolor/malestar y ansiedad/depresión) y con tres niveles de gravedad (sin problemas, algunos problemas o problemas moderados y problemas graves) que el individuo valoró del 1 al 3 en función del nivel de gravedad correspondiente a “su estado de salud hoy”.

La segunda parte del EQ-5D es una escala visual analógica (EVA) que oscila entre 0 (peor estado de salud) a 100 (mejor estado de salud). En ella, el individuo debe marcar el punto en la línea vertical que mejor refleje la valoración de su estado de salud global en el día de hoy. La EVA, al ser una medida cuantitativa, permite comparar medias o medianas entre grupos y observar los cambios que se producen en el tiempo (Herdman y col., 2001).

La tercera parte del cuestionario consiste en una escala temporal (ET), que compara el estado general de salud percibido por el paciente con el de hace doce meses, y que describen como mejor, igual o peor, asignando valores de 1, 2 y 3 respectivamente.

La base del estudio se completó con unas cuestiones sociodemográficas EuroQol (Badía y Baró, 2001).

El EQ-5D se realizó con un programa informático específico en Visual Basic 6.0 para el trabajo de recogida, validación, cálculo de tarifas, estadística básica y digitalización de los datos ligados al cuestionario para su posterior explotación numérica detallada (Murcia y col., 2008).

### **3.4.2. Multiple Sclerosis Quality of Life 54 (MSQOL-54)**

El Multiple Sclerosis Quality of Life 54 (MSQOL-54) (Anexo II) es un cuestionario autoadministrado, aunque también se puede cumplimentar mediante entrevista, que es como se llevó a cabo en nuestro estudio.

Se basa en el instrumento genérico RAND Health Survey Short Form (SF-36) del que recoge sus 36 ítems y completa con otros 18 ítems específicos de EM: preocupación por la salud (4 ítems), función sexual (4 ítems), satisfacción con la función sexual (1 ítem), calidad de vida en general (2 ítems), función cognitiva, (4 ítems), energía (1 ítem), dolor (1 ítem) y función social (1 ítem). Cuestiona 54 ítems, distribuidos 52 en 12 dimensiones y 2 ítems aislados, que miden el cambio en el estado de salud y satisfacción con la función sexual.

El cuestionario está redactado en inglés y fue aplicado por personal cualificado y entrenado. La puntuación total de cada una de las dimensiones es de 0-100, indicando mejor CVRS el valor más elevado. Por ponderación de las dimensiones correspondientes se obtienen dos subtotales, correspondientes a dos escalas: salud mental y física (Vickrey y col., 1995).

Se eligió este instrumento por ser el cuestionario específico más utilizado para la EM (Meyers y col. 2000), por la buena aceptación que tiene por parte de los pacientes y porque no requiere la participación del neurólogo (Vickrey y col. 1995).

### **3.4.3. Índice de Katz**

Indicado para valorar las actividades básicas de la vida diaria, se administra mediante un cuestionario con 6 ítems dicotómicos, que evalúan la capacidad o incapacidad de efectuar una serie de tareas: bañarse, vestirse, usar el retrete, traslados, continencia y alimentación (Anexo III). Cada una de las 6 AVD se evalúa del 1 al 3; siendo 1 el mayor grado de independencia, 2 el grado medio y 3 el mayor grado de dependencia (Katz y col., 1963).

El resultado final se expresó, en función de la mayor o menor independencia para realizar dichas funciones, mediante letras mayúsculas que representan 8 niveles o grados de dependencia:

**A.** Independiente en todas las 6 funciones.

**B.** Independiente en todas las funciones menos en una de ellas.

**C.** Dependiente en el baño y otra función.

**D.** Dependiente en el baño, vestido y otra función.

**E.** Dependiente en el baño, vestido, uso del lavabo y otra función.

**F.** Dependencia en el baño, vestido, uso del lavabo, traslados y otra función de las 2 restantes.

**G.** Dependiente en todas las 6 funciones.

**OTRO:** Dependiente en al menos 2 funciones, pero no clasificado como C, D, E o F.

Luego A es el grado con más independencia y G el grado más dependiente de la escala (Katz y col., 1963).

De una manera convencional y más operativa se puede asumir la siguiente clasificación:

**Grados A-B:** ausencia de incapacidad o incapacidad leve.

**Grados C-D:** incapacidad moderada.

**Grados E-G:** incapacidad severa.

Para la recogida, validación, cálculo de valoraciones, estadística básica y digitalización de los datos ligados al IK y su posterior explotación numérica detallada se utilizó el programa informático específico Visual Basic 6.0 (Murcia y col., 2008).

#### **3.4.4. Índice de Barthel**

El índice de Barthel valora la funcionalidad del paciente en relación a 10 actividades de la vida diaria, que se consideran básicas estimando su grado de independencia: comer, trasladarse entre la silla y la cama, aseo personal,

uso del retrete, bañarse y/o ducharse, desplazarse (andar en superficie lisa o en silla de ruedas), subir/bajar escaleras, vestirse/desvestirse, control de las deposiciones y control de orina (Anexo IV). (Mahoney y Barthel, 1965).

La recogida de información se realizó mediante interrogatorio al paciente. Las actividades se valoraron en función de la necesidad de ayuda para realizarlas, asignando 0 (caso de dependencia total) y 5, 10 ó 15 puntos, en función del grado de independencia manifestado.

El IB aportó información sobre la funcionalidad del paciente para cada una de las actividades valoradas, que ayuda a conocer las deficiencias individuales, y dio una puntuación total (IB), suma de los puntos de los 10 ítems,

La puntuación global varía entre el valor mínimo de 0 (completamente dependiente) al máximo de 100 (completamente independiente) (Mahoney y Barthel, 1965; Wylie, 1987) y puede interpretarse en la siguiente clasificación (Shah y col., 1989):

- **0-20**, Dependencia total
- **21-60**, Dependencia severa
- **61-90**, Dependencia moderada
- **91-99**, Dependencia escasa
- **100**, Independencia total

Se utilizó el programa informático específico en Visual Basic 6.0 para la recogida, validación, cálculo de valoraciones, estadística básica y digitalización de los datos ligados al IB que posteriormente fue explotado numéricamente (Murcia y col., 2008).

### 3.4.5. Índice de Tinetti

La escala de Tinetti es un instrumento útil para detectar alteraciones en la marcha y equilibrio del paciente. Valora mediante observación directa una serie de actividades y tareas que ejecutará el paciente (Anexo V). Esta prueba es realizada por un fisioterapeuta que caminará detrás del paciente al que solicita responda a preguntas relacionadas con la marcha. El tiempo aproximado de aplicación es de 8 a 18 minutos.

Está integrado por dos subescalas que valoran el equilibrio, que puntúa de 0 a 16, y la marcha de 0 a 12. La suma de las puntuaciones en las dos subescalas da una puntuación total que informa del riesgo de caídas. (Faber y col., 2006).

La valoración mediante la *subescala del equilibrio* (Buyere y col., 2005) evalúa:

- ✓ *Equilibrio sentado* en una silla dura sin antebrazos, observando la estabilidad y seguridad y que se levante y se siente sin ayuda o con ayuda de los brazos, teniendo en cuenta los intentos para realizar esta acción.
- ✓ *Equilibrio en bipedestación* inmediata durante los primeros 5 segundos, y la estabilidad de pie por un tiempo prolongado.
- ✓ *Estabilidad con los ojos abiertos y pies juntos*, empujando suavemente en el esternón del paciente tres veces.
- ✓ *Equilibrio de pie con ojos cerrados* por unos segundos.
- ✓ *Equilibrio realizando un giro de 360°*.
- ✓ Se le pide que se siente de nuevo observando la seguridad y el uso de los brazos

La *valoración de la marcha* se realiza con el paciente de pie al que se le pide que camine a su paso habitual, con la ayuda que suele utilizar (bastón o andador), durante un tiempo, pasado el cual regresará con un paso más rápido pero seguro.

Se consideran varios aspectos como la iniciación de la marcha, longitud, simetría, altura y fluidez del paso, trayectoria, oscilaciones del tronco y posición de los talones al caminar.

Cada una de las actividades observadas se puntúa con una escala ordinal de 0 a 2 puntos, donde 0 representa el máximo deterioro y 2 (1 en ciertas funciones) supone la independencia del paciente en esa función. Las puntuaciones obtenidas se suman para cada función obteniendo tres medidas: *equilibrio* (sobre 16 puntos), *marcha* (sobre 12 puntos) y otra *total* (suma de las dos anteriores, de 0 a 28 puntos). A mayor puntuación mejor funcionamiento. Una puntuación de menos de 19 puntos supone un riesgo alto de caídas, entre 19 y 24 puntos implica un moderado riesgo de caídas y entre 25 y 28 puntos el riesgo es mínimo (Sterke y col., 2010).

### **3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables cualitativas se describieron como frecuencias y las variables cuantitativas se presentaron como media (desviación estándar) y porcentajes.

Para el contraste de hipótesis se utilizaron pruebas paramétricas o no paramétricas, según se confirmó o no la normalidad de la distribución de las variables.

Las diferencias entre el antes y después se analizaron con la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon para las variables cuantitativas. Se compararon la media y la desviación estándar, estableciendo un nivel de significación  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , para las variables edad; parámetros bioquímicos; valores antropométricos; frecuencia del número de

raciones de alimentos; ingesta calórica y distribución de macronutrientes en la dieta.

Se contrastaron los porcentajes respecto a las características sociodemográficas y clínicas y los parámetros del riesgo nutricional según CSSN, entre el antes y después de la intervención. Así mismo se compararon las puntuaciones en la escala EVA del EQ-50, en el cuestionario MSQOL-54 y en la escala Tinetti, entre el antes y después de la intervención.

Las comparaciones de los porcentajes de cumplimiento de las recomendaciones de la pirámide de alimentación y las de los porcentajes de ajuste a las recomendaciones de energía y nutrientes en los pacientes, antes y después de la intervención, en base al CFC, se comprobaron mediante el test no paramétrico Chi-cuadrado de Pearson, considerándose diferencias significativas, para  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ .

Para las variables categóricas se utilizó el índice de kappa que mide el grado de acuerdo de una medida con la misma después de un tiempo, categorización obtenida de los cuestionarios CSSN, EQ-5D, índice de Barthel e índice de Katz.

Para el tratamiento de los datos sociodemográficas, personales, así como de los obtenidos de las pruebas aplicadas a los pacientes, se utilizó el programa Microsoft Excel versión 2013, exportándose posteriormente al programa estadístico SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.) para su análisis estadístico.







## ***4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN

Las características sociodemográficas: edad, género, ciudad de residencia, estado civil, nivel de estudios, situación profesional, grado de discapacidad, tipo de EM y EDSS, fueron obtenidas en la primera entrevista a los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión para entrar a formar parte del presente estudio de manera voluntaria y una vez firmado el Consentimiento Informado.

Un total de 24 pacientes diagnosticados de EM han participado en este estudio. Todos ellos presentaron una EDSS menor de 6,5. La *Tabla 11* refleja las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes. La mayoría de los pacientes pertenecían a la Asociación de EM de Albacete, sólo 4 pertenecían a la Asociación de EM de la provincia de Almería.

La media de edad fue de 46,5 (11,1) años. La población está compuesta por 13 mujeres (54,2%) y 11 hombres (45,8%). La mayoría de los pacientes estaban casados (54,2%) y el resto solteros (37,5%) y divorciados (8,3%). Un 37,5% de la población tenían empleo, el 8,3% estaba en desempleo, 8,3% eran amas de casa y un 45,8% jubilados o pensionistas.

El tipo de EM mayoritaria diagnosticada es la Remitente recurrente (45,8%), seguida de la Primaria progresiva (20,8%), Benigna (12,5%), Progresiva y Secundaria progresiva con el mismo porcentaje (4,2%). El diagnóstico de la EM es un proceso complejo que conlleva múltiples pruebas lo que explica que 3 de los pacientes (12,5%) estuvieran en proceso de valoración y no se incluyera en ninguno de los tipos de EM.

Los resultados de la escala según el grado de severidad de discapacidad, muestran un 91,7% de pacientes entre 3 y 6,5. Sólo en el 8,3% de los pacientes mostró un valor menor de 3.

Respecto al Grado de Discapacidad reconocido por el Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales (BOE 26-1-2000), 45,8% de los pacientes tenían discapacidad leve (Grado 2) y el resto (54,2%) presentó discapacidad moderada y severa (Grados 3 y 4). Ninguno de los pacientes presentó grado de discapacidad grave.

Tabla 11. Descripción de las características sociodemográficas y clínicas de la población estudiada

	Nº de pacientes (n = 24)	Porcentaje
<b>Edad (años)</b>		46,5 (11,1) <sup>a</sup>
<b>Género</b>		
Hombre	11	45,8
Mujer	13	54,2
<b>Ciudad de residencia</b>		
Albacete	20	83,3
Almería	4	16,7
<b>Estado civil</b>		
Soltero/a	9	37,5
Casado/a	13	54,2
Viudo/a	0	0
Separado/a	0	0
Divorciado/a	2	8,3
<b>Nivel de estudios</b>		
Sin estudios	8	33,3
Educación primaria	11	45,8
Educación secundaria	2	8,3
Enseñanza universitaria	3	12,5
<b>Situación profesional</b>		
Empleado/Autónomo	9	37,5
Desempleo	2	8,3
Jubilado/pensionista	11	45,8
Ama de casa	2	8,3
Estudiante	0	0
<b>Grado de discapacidad</b>		
Leve	11	45,8
Moderado-Severo	13	54,2
<b>Tipo de esclerosis múltiple</b>		
Remitente recurrente	11	45,8
Progresiva	1	4,2
Primaria progresiva	5	20,8
Secundaria progresiva	1	4,2
Benigna	3	12,5
En valoración	3	12,5
<b>EDSS</b>		
≤3	2	8,3
>3 y <6,5	22	91,7

<sup>a</sup>Valores presentados como la media (desviación estándar)

## 4.2. RESULTADOS DE LA CALIDAD DEL AZAFRÁN

### 4.2.1. Estudio teórico de la concentración óptima del azafrán

El azafrán ha sido utilizado en la alimentación durante siglos y esto apoya su seguridad en condiciones de consumo (Moshiri y col., 2015). En los últimos tiempos y como consecuencia de su utilización en ensayos clínicos se han realizado numerosos estudios para evaluar su posible toxicidad en animales de experimentación y en estudios in vitro (Srivastava y col., 2015); valorándose la variación en el hemograma y en pruebas de coagulación (Mansoori y col., 2011), presión arterial y electrocardiograma (Modaghegh y col., 2015), sin observarse cambios importantes en ninguno de estos parámetros que pudieran sugerir toxicidad.

Tras la búsqueda bibliográfica realizada, se revisaron 42 artículos. Se determinó utilizar una dosis de 50 mg de azafrán, por reunir las condiciones de seguridad y eficacia a la luz de la literatura y ensayos clínicos revisados.

En la *Tabla 12* se recogen los principales trabajos de investigación obtenidos de la amplia documentación recogida en las bases de datos PubMed, Scopus y SciFinder y en los buscadores de ensayos clínicos, Embase, ClinicalTrials y OpenGrey, atendiendo a criterios de revista indexada, impacto o información requerida. La *Tabla 12* refleja el tipo o forma de muestra elegida para el estudio, número de pacientes, patología que padecen, dosis utilizada, duración de la administración y autores.

La mayoría de los artículos consultados describen la muestra por el tipo de extracto utilizado o por la forma de administración, encontrándose deficiencias en las descripciones, que en muchas ocasiones la expresan de forma genérica como azafrán.

Teniendo en cuenta que se consigue efectividad con menos de 30-50 mg/día (Moshiri y col., 2015) se estableció una dosis de azafrán para la preparación de la

infusión de 50 mg de azafrán, DOP Azafrán de la Mancha, en una única toma diaria durante 93 días. Esta cantidad no está alejada de la utilizada en las técnicas culinarias en el uso de esta especia como condimento.

Tabla 12. Descripción de ensayos clínicos desde 2009-2014 con forma de administración, tamaño de la muestra, dosis en mg de azafrán por día, duración y referencias

Forma	n <sup>a</sup>	Patología	D <sup>b</sup>	Días	Autor/es
Cápsula	46	Alzheimer	30	112	Akhondzadeh y col.,2010a
Azafrán	35	Degeneración macular	20	84	Falsini y col., 2010
Tableta	45	Enfermedad inmunológica	100	21	Kianbakht y Ghazabi, 2011
Azafrán	260	Infertilidad	60	182	Safarinejad y Safarinejad, 2011
Azafrán	36	Disfunción sexual	30	28	Modabbernia, 2012
Tableta	60	Degeneración macular	43	7	Ayatollahi y col., 2013
Azafrán	34	Disfunción sexual mujeres	30	42	Kashani y col., 2013
Suplemento oral	33	Degeneración macular	20	84	Marangoni y col., 2013
Extracto acuoso	17	Glaucoma primario	30	28	Jabbarpoor y col., 2014
Cápsula	40	Depresión	30	42	Shahmansouri y col., 2014

<sup>a</sup> n<sup>o</sup> individuos muestra; <sup>b</sup> dosis mg/día

#### 4.2.2. Estudio cinético de la extracción de azafrán

Se realizó el estudio cinético de extracción para estudiar el tamaño de partícula óptimo de la materia vegetal. Se probaron tres formatos: hebra, triturado y molido (*Figura 25-27*). Por espectrofotometría UV-Vis se midió el poder colorante, aromatizante y amargo, que determinan la calidad del azafrán a los distintos tiempos de extracción. Una vez fijado el formato más adecuado para la extracción y mediante HPLC-DAD se determinaron las condiciones óptimas de

ingesta por los pacientes de EM: tiempo de reposo de la infusión, temperatura de extracción y las concentraciones máximas extraídas de sus compuestos bioactivos.



Figura 25. Azafrán molido



Figura 26. Diferencias entre molido y triturado

No hay datos de valores de extracción respecto al tamaño de partícula del azafrán. Dutta y Bhattacharjee (2015) estudiaron el tamaño de partícula óptimo para obtener el máximo rendimiento de piperina en pimienta negra, resultando ser  $0,42 \pm 0,02$  mm de diámetro, tamaño similar al del azafrán molido de nuestro estudio, 0,5 mm de diámetro. Sin embargo, otros autores (Torun y col., 2015) obtuvieron un tamaño de partícula óptimo de 2-8 mm para *Salvia fruticosa*, 140 mm para alantolactona y la isosalantonactona en la raíz de *Inula helenium* (enula o helenio) (Zhao y col 2015) o como el de Cam y col. (2015) con un tamaño de partícula óptimo comprendido entre 212-500  $\mu$ m para la extracción de fenoles en la cáscara de granada.

En primer lugar, se determinaron mediante UV-Vis los espectros entre 190 y 700 nm de los extractos a cada uno de los tiempos de infusión. En una segunda experiencia se determinaron los componentes bioactivos principales del azafrán: picrocrocina, safranal y crocinas, mediante HPLC-DAD.



Figura 27. Extracción acuosa del formato hebra

Las Figuras 28, 29 y 30 muestran los espectros UV-Vis entre 190 y 700 nm, en los minutos 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13 y 15 de la infusión del azafrán, para los tres formatos hebra (Figura 28), triturado (Figura 29) y molido (Figura 30).

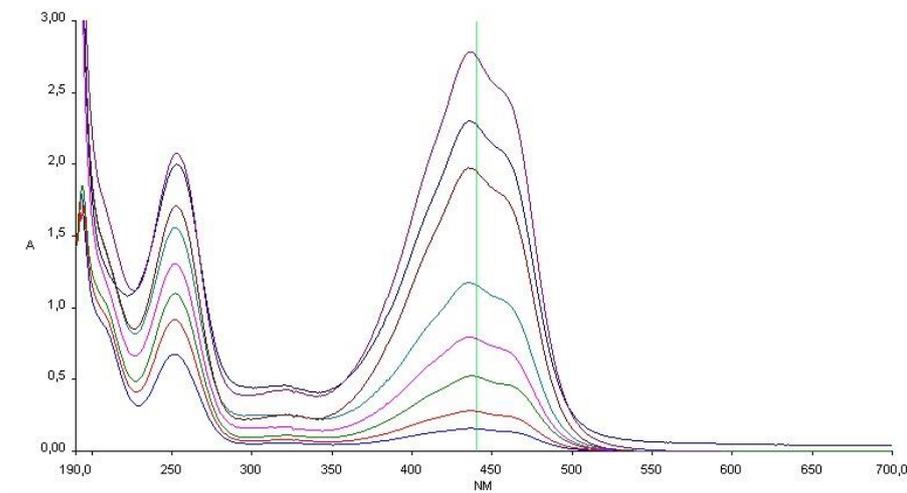


Figura 28. Barrido espectrofotométrico en el UV-Vis desde 190 a 700 nm en los minutos 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13 y 15 de la infusión del azafrán en hebra

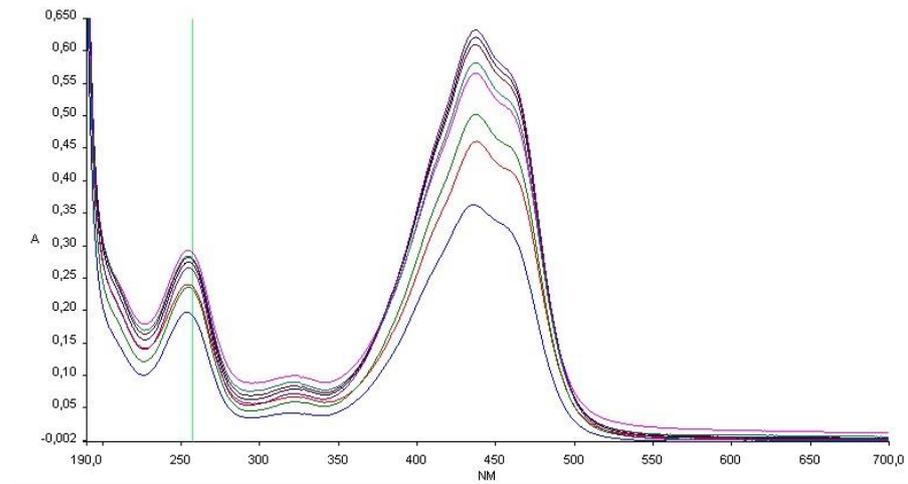


Figura 29. Barrido espectrofotométrico en el UV-Visible desde 190 a 700 nm a lo largo de 15 minutos en una infusión de azafrán en triturado

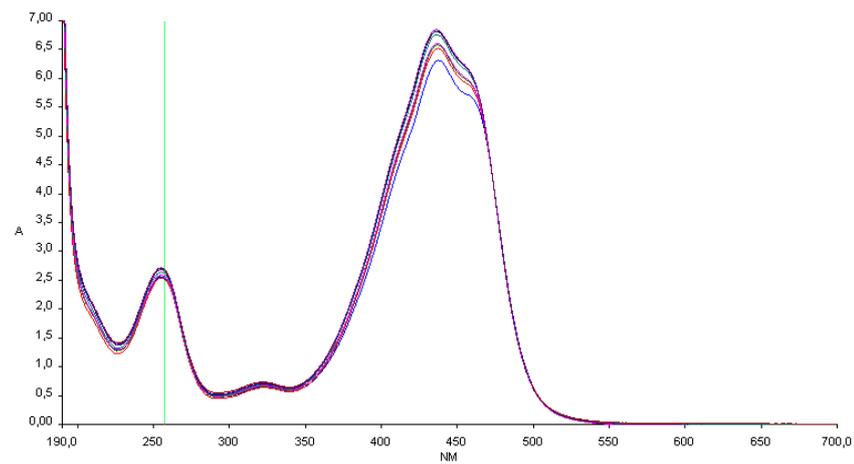


Figura 30. Barrido espectrofotométrico en el UV-Visible desde 190 a 700 nm a lo largo de 15 minutos en una infusión de azafrán molido

La *Tabla 13* muestra las temperaturas y absorbancias en el UV-Vis a las longitudes de onda 257 nm (poder amargo), 330 nm (poder aromático) y a 440 nm (poder color) de azafrán en hebra, triturado y molido de acuerdo a la Norma ISO 3632 (2011).

Tabla 13. Resultados de las absorbancias en el UV-Vis a 257 nm (poder amargo), 330 nm (poder aromático) y 440 nm (poder colorante) del azafrán en hebra, triturado y molido

t (min)	T (°C)	Absorbancias								
		257 nm			330nm			440nm		
		h	t	m	h	t	m	h	t	m
<b>1</b>	80	0,063	0,192	0,254	0,005	0,041	0,063	0,016	0,359	0,628
<b>2</b>	76	0,058	0,237	0,252	0,008	0,065	0,062	0,028	0,458	0,647
<b>3</b>	74	0,103	0,232	0,256	0,011	0,058	0,064	0,052	0,499	0,652
<b>5</b>	70	0,123	0,289	0,257	0,015	0,096	0,065	0,078	0,562	0,655
<b>7</b>	67	0,148	0,280	0,261	0,024	0,085	0,066	0,116	0,578	0,669
<b>10</b>	63	0,164	0,279	0,269	0,024	0,080	0,070	0,195	0,605	0,674
<b>13</b>	58	0,194	0,272	0,266	0,043	0,077	0,067	0,228	0,617	0,675
<b>15</b>	56	0,209	0,263	0,268	0,041	0,069	0,067	0,275	0,627	0,677

Las absorbancias aumentan progresivamente con el paso del tiempo en todos los formatos, si bien conforme disminuye el tamaño de partícula, las concentraciones máximas se alcanzan antes (*Tabla 13*). A partir de los valores de absorbancias se procesaron los datos en Microsoft Office Excel para obtener las ecuaciones cinéticas, representando estas frente al tiempo en cada una de las longitudes de onda a efectos de analizar el tiempo al que se produce la saturación.

Las evoluciones de la cinética para los tres parámetros se reflejan en la *Figura 31a* (257 nm), *Figura 31b* (330 nm) y *Figura 31c* (440 nm) determinadas por UV-Vis para el azafrán en los tres formatos.

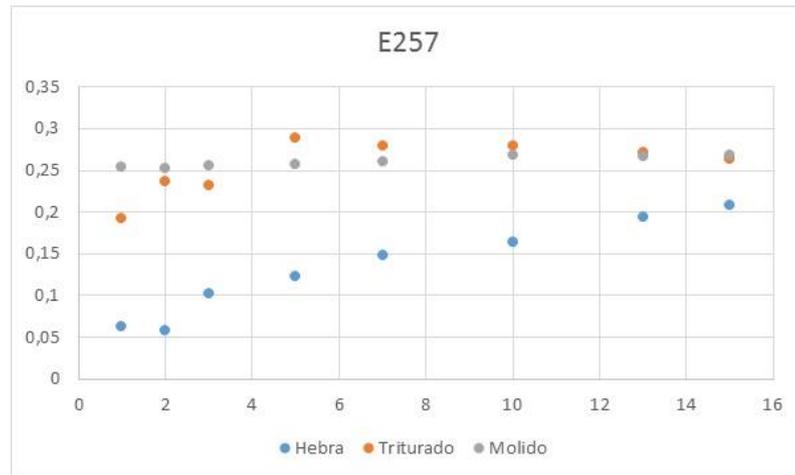


Figura 31a. Cinética obtenidas del UV-vis a 257 nm (picrocrocina) de una infusión de azafrán en formato hebra, triturado y molido

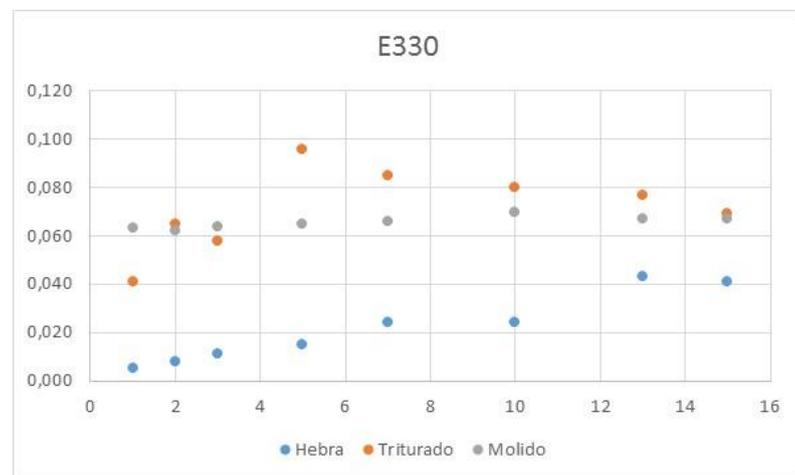


Figura 31b. Cinética obtenidas del UV-vis a 330 nm (safranal) de una infusión de azafrán en formato hebra, triturado y molido

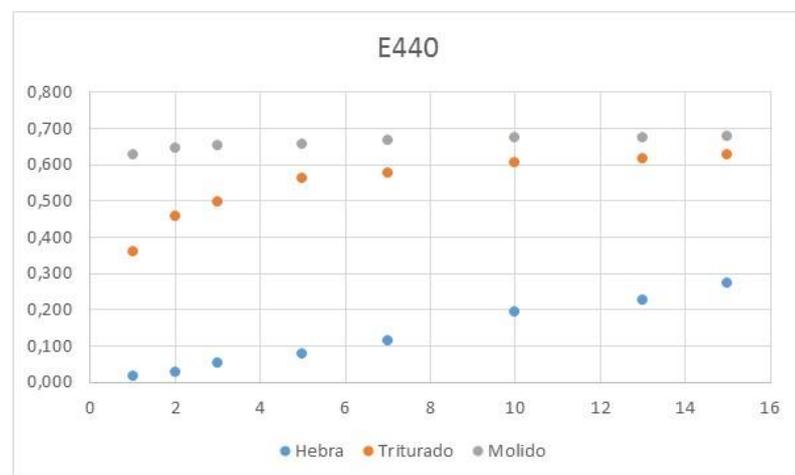


Figura 31c. Cinética obtenidas del UV-vis a 440 nm (crocinas) de una infusión de azafrán en formato hebra, triturado y molido

Las cinéticas pusieron de manifiesto que las sustancias se disuelven rápidamente en los primeros minutos. Comparando los datos de los tres formatos se observó que el azafrán molido obtuvo la mayor absorbancia a las tres longitudes de onda respecto al del resto de formatos. Además, la extracción de los compuestos bioactivos fue un proceso más rápido (Figuras 31a, 31b, 31c) apreciándose desde el minuto 3 concentraciones a nivel de saturación debido a su menor tamaño de partícula. La extracción en el formato hebra se produjo de forma progresiva en el tiempo, mientras que en el caso de utilizar azafrán triturado la situación fue intermedia (Figuras 31a, 31b, 31c).

Para el azafrán molido se observó que, a partir del minuto 5, las concentraciones son altas y, prácticamente, en el minuto 7 de extracción son máximas. Además, la extracción de compuestos bioactivos fue un proceso más rápido que en el resto de formatos. La extracción en el formato hebra se produjo de forma progresiva con el tiempo, mientras que en el caso del azafrán triturado la situación fue intermedia.

Teniendo en cuenta que considerar que toda la absorción a 330 nm por UV-visible no puede atribuirse a la picrocrocina, pues a esa longitud de onda también absorben las crocinas cis y toda la absorción a 257 nm por UV-visible no puede atribuirse al safranal, ya que a esa longitud de onda absorben además las crocinas trans, este método nos orienta sobre el formato más adecuado para la extracción de metabolitos y el tiempo de extracción pero no de las concentraciones de estas sustancias activas que obtuvimos mediante HPLC-DAD.

Este resultado decidió que la forma de azafrán molido fuera la utilizada para la preparación de la infusión y que esta fuera tomada tras un tiempo de reposo de 10 minutos, tiempo suficiente para conseguir concentraciones óptimas y una temperatura adecuada de consumo.

Para corroborar los datos obtenidos mediante espectrofotometría UV-Vis y obtener mayor precisión en los resultados sobre el tiempo de reposo para obtener la máxima extracción de compuestos bioactivos en las infusiones de azafrán, se realizó un estudio cinético mediante HPLC-DAD del azafrán molido.

Se analizaron los componentes bioactivos del azafrán (crocinas, safranal y picrocrocina) con el azafrán molido pudiéndose cuantificar cada uno de ellos de manera más exacta que mediante espectrofotometría UV-Vis.

A continuación, se muestran las ecuaciones de las cinéticas y longitud de onda obtenidas a partir de las áreas (Tabla 14) correspondientes de picrocrocina (Figura 32a), safranal (Figura 32b) y total de crocinas (Figuras 32c-32d), obtenidos mediante HPLC-DAD.

Tabla 14. Áreas de los picos cromatográficos a las longitudes de onda ( $\lambda$ ) correspondientes a los máximos de absorción de safranal, picrocrocina y de las principales crocinas al tiempo de infusión muestreado (t) obtenidos mediante HPLC-DAD

ÁREAS							
$\lambda$ (nm)	257	330	440				
t(min)	Safranal	Picrocrocina	<i>trans</i> -4-GG	<i>trans</i> -3-Gg	<i>trans</i> -2-gg	<i>cis</i> -4-GG	<i>cis</i> -3-Gg
1	4,55	1086,75	3348,85	1195,70	53,40	186,80	50,30
2	5,30	1099,10	3299,90	1096,20	48,40	145,40	63,20
3	4,90	1099,40	3297,50	1102,35	53,30	136,05	89,05
5	4,45	1123,90	3814,00	1280,60	61,60	163,25	99,15
7	3,75	1127,90	3893,25	1298,55	63,35	156,40	104,45
10	3,35	1137,60	4138,25	1390,70	68,45	157,95	116,55
13	3,25	1138,35	3955,25	1290,25	60,80	136,55	118,55
15	3,05	1136,40	3902,25	1287,70	64,00	147,35	116,70

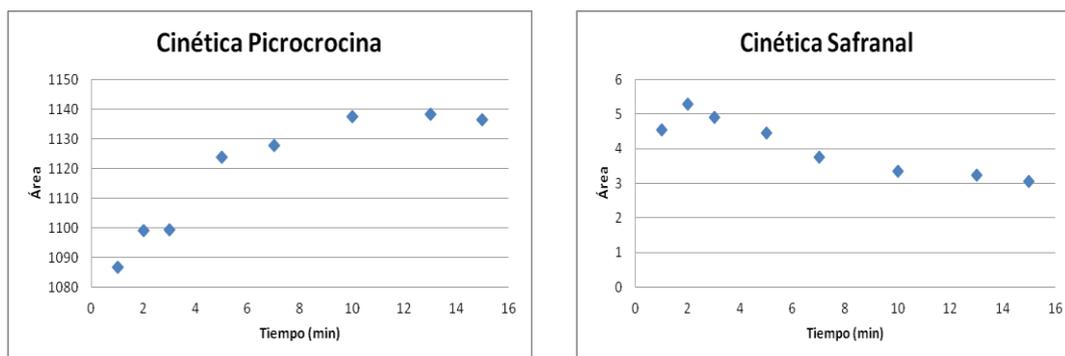


Figura 32 a y b. Cinética obtenida por HPLC-DAD para picrocrocina y safranal en azafrán molido

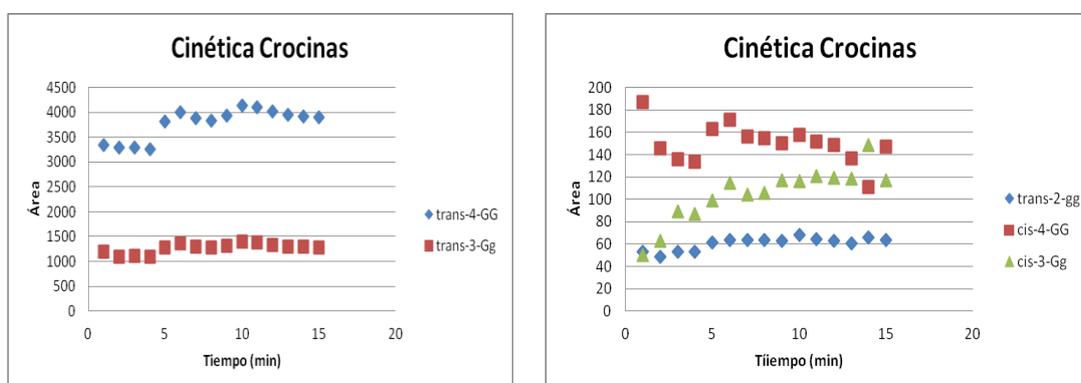


Figura 32 c y d. Cinética obtenida por HPLC-DAD para crocinas *trans*-4-GG y *trans*-3-Gg y *trans*-2-gg, *cis*-4-GG y *cis*-3-Gg en azafrán molido

La concentración máxima de picrocrocina se alcanza aproximadamente en el minuto 9 (Figura 32a). En la Figura 32b, que representa las absorbancias del safranal, se pone de manifiesto que entre los minutos 10 y 11 llegamos al máximo de concentración estable.

Comparando las gráficas de las Figuras 31a y 32a, respecto a la picrocrocina y las Figuras 31b y 32b del safranal, concluimos que no es adecuado determinar mediante el método UV-Vis el contenido de picrocrocina y safranal. Por este método, el safranal, al que la literatura atribuye la acción de mejora del estado de ánimo, no estaría bien determinado a absorbancias medidas en UV-Vis a 330 nm, pues la determinación hecha por HPLC-DAD, indica que el momento donde el contenido es más alto en safranal es el minuto 11. Por tanto la medida más

adecuada para determinar concentraciones se obtiene por el método de HPLC-DAD, evitando dosificaciones erróneas.

#### 4.2.3. Dosificación del azafrán especia

La forma decidida para preparar la infusión de la especia, formato azafrán molido, fue envasada por la empresa Verdú-Cantó (Villena, España) en sobres monodosis, acondicionados para proteger al azafrán de la luz y la humedad, asegurando su seguridad, eficacia de administración y conservación. Cada sobre contenía 50 mg con una desviación de +/- 5 mg de azafrán molido, debido a las limitaciones de la envasadora para conseguir una masa exacta.

Los pacientes recibieron una charla informativa para instruirles de la forma de preparación de la infusión de azafrán. Se les suministró 93 sobres en 3 cajas (2 cajas de 45 sobres y 1 con 48). Las cajas que contenían los sobres recordaban las instrucciones de preparación (*Figura 33*).



Figura 33. Presentación de las cajas conteniendo el azafrán

Los pacientes prepararon las infusiones vertiendo el contenido del sobre en una taza con 200 mL de agua de 95-100°C, y tomaron la infusión en 10 minutos.

#### 4.2.4. Caracterización del azafrán

##### ***Calidad alimentaria: Espectrofotometría UV-Vis***

El seguimiento de la calidad alimentaria del azafrán que tomaron los pacientes se realizó mediante la determinación de los parámetros marcados por la

norma más empleada internacionalmente, ISO 3632 (2011), que mide con espectrofotometría UV-Vis la absorción de un extracto acuoso de azafrán. Los valores de la calidad alimentaria de nuestra muestra de azafrán se reflejan en la *Tabla 15* Se realizaron tres controles mediante espectrofotometría UV-Vis: al inicio (primer control), a los 45 días (segundo control) y tras finalizada la toma del azafrán, a los 93 días (tercer control). La *Tabla 15* recoge los coeficientes de extinción ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) de las muestras de azafrán molido estudiadas a las longitudes de onda 257, 330 y 440 nm según la Norma ISO 3632 (2011).

La calidad del azafrán de partida (primer control) se ajustó a la categoría I, o de calidad máxima según la categorización de la norma ISO 3632 (2011) (*Tabla 8* de materiales y métodos), consecuentemente, con un alto contenido de metabolitos bioactivos. Además, esta calidad no sufrió variación durante los 93 días de duración de la intervención, como se observa en los resultados de los tres controles realizados (*Tabla 15*).

Tabla 15. Absorbancias (A) y coeficientes de extinción (E) de las muestras estudiadas a las diferentes longitudes de onda donde aparecen los compuestos bioactivos del azafrán en UV-V según la Norma ISO 3632 (2011) en los tres controles realizados al inicio (calidad de origen), 45 días y 93 días

	Tiempo(días)	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 440 nm	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 440 nm	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 440 nm
<b>Primer control</b>	0	84,4	31,6	228,8
<b>Segundo control</b>	45	87,1	33,6	226,1
<b>Tercer control</b>	93	66,2	20,2	218,9

### **Identificación y cuantificación de metabolitos: HPLC**

La estabilidad de la composición de compuestos bioactivos se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución con diodos alineados (HPLC-DAD). Así pudo cuantificarse los compuestos bioactivos y resolver el problema de interferencias en las absorbancias a 257 y 330 nm con otras sustancias distintas de la picrocrocina y safranal que presenta la Norma ISO 3236, explicadas en materiales y métodos. Estas absorbancias (257, 330 y 440 nm) se corresponden a los máximos de absorción de la picrocrocina, safranal y crocinas, principales componentes del azafrán, si bien hay interferencias en las absorbancias a 257 y 330 nm con otras sustancias distintas de la picrocrocina y safranal, como lo demuestran numerosos trabajos (García-Rodríguez y col. 2014 y 2017).

Los resultados de la concentración de compuestos bioactivos del azafrán, expresados en mg/100mg de azafrán se recogen en la *Tabla 16* para la picrocrocina y safranal y en la *Tabla 17* para la suma de las 11 crocinas más abundantes. También se refleja la suma total de crocinas, la suma de crocinas *trans*, la suma de crocinas *cis*, y la relación entre las crocinas *cis* y *trans* expresada en porcentaje (*Tabla 18*). La obtención de estos datos a partir de las áreas del cromatograma, que separa, identifica y cuantifica los diferentes componentes, se explica en materiales y métodos.

Tabla 16. Control de las concentraciones de safranal y picrocrocina de las muestras administradas a los pacientes expresadas en mg/100mg de azafrán por el método HPLC-DAD al inicio (calidad de origen), 45 días y 93 días

	<b>Tiempo (días)</b>	<b>Safranal</b>	<b>Picrocrocina</b>
<b><i>Primer control</i></b>	0	0,110	12,300
<b><i>Segundo Control</i></b>	45	0,276	12,930
<b><i>Tercer control</i></b>	93	0,297	13,031

El porcentaje de picrocrocina (12,30; 12,90 y 13,00 %) no varió significativamente a lo largo del estudio (*Tabla 16*). Sus niveles son altos comparados con los de Lage y Cantrel (2009), los de Alonso y col. (2000) con valores entre 0,79-12,94 %, similares a los referidos por del Campo y col. (2010). Y con diferencias importantes frente a los datos de estudios realizados para azafrán iraní (2,18-6,15 %) y el indio (1,7-2,16 %).

Los porcentajes de safranal en el estudio (0,11; 0,28 y 0,30 %) tuvieron un leve, pero significativo, incremento con el paso del tiempo (*Tabla 16*). Estos valores son similares a los obtenidos por García-Rodríguez y col. (2017) para azafrán español (0,10-0,43 %).

Tabla 17. Control de las concentraciones de las crocinas de las muestras administradas a los pacientes expresadas en mg/100mg de azafrán por el método HPLC-DAD al inicio (calidad de origen), 45 días y 93 días

	Primer Control	Segundo control	Tercer control
Tiempo (días)	0	45	93
<i>trans-5-tG</i>	0,125	0,178	0,171
<i>trans-5-nG</i>	0,126	0,179	0,753
<i>trans-4-GG</i>	3,532	9,721	8,731
<i>trans-4-nG</i>	0,358	0,239	0,202
<i>trans-3-Gg</i>	10,423	6,618	5,729
<i>trans-2-gg</i>	4,269	1,195	1,088
<i>trans-2-G</i>	0,122	0,333	0,783
<i>cis-4-GG</i>	0,646	0,721	0,572
<i>cis-3-Gg</i>	0,921	1,249	0,718
<i>cis-2-gg</i>	0,459	0,479	0,105
<i>cis-2-G</i>	0,174	0,025	0,014

El porcentaje de la suma de las crocinas decreció ligeramente (21,15; 20,90 y 18,86%) durante el periodo de administración, mostrando significativas diferencias entre el segundo y tercer control. De cualquier modo, estas concentraciones son muy superiores a las obtenidas por Anastasaki y col (2010) para azafrán español, griego, iraní e italiano. Los porcentajes de las crocinas identificadas en nuestro azafrán se reflejan en las *Tablas* 17 y 18.

Tabla 18. Control de las concentraciones de suma total de crocinas, suma crocinas *trans*, suma crocinas *cis*, expresadas en mg/100mg de azafrán, por el método HPLC-DAD al inicio (calidad de origen), 45 días y 93 días. Relación crocinas *cis* /*trans* en porcentaje

	Tiempo (días)	Suma crocinas	Suma <i>trans</i>	Suma <i>cis</i>	<i>cis/trans</i>
<b>Primer control</b>	0	21,15	18,95	2,20	8,6
<b>Segundo control</b>	45	20,90	18,43	2,47	7,5
<b>Tercer control</b>	93	18,86	17,45	1,40	12,5

La crocina *trans*-4-GG es la crocina mayoritaria en el azafrán y de la que derivan el resto de crocinas, constituye el 60% de las crocinas totales (Cossignani y col., 2014) en nuestro caso representó un 3,53; 9,72 y 8,73%, valores que están dentro del rango obtenido por Alonso y col (2000) (0,46-12,12%). Cabe resaltar la mayor concentración de la *trans*-3-GG, especialmente en el primer control. La *trans*-3-GG es la segunda crocina más importante con un rango comprendido entre 0,01-9,44%, obteniendo en nuestro estudio porcentajes de 10,42; 6,61 y 5,72%.

Respecto al total de crocinas *cis*, el porcentaje permanece estable los dos primeros controles para caer en el tercero (0,46; 0,48 y 0,11%). Los valores fueron bajos para la *cis*-4-GG (0,65; 0,72 y 0,57%) y la *cis*-3-Gg (0,92; 1,25 y 0,72%), en

nuestro azafrán molido, respecto a los descritos por Alonso y col (2000), 0,04-8,53% y 0,01-2,26% respectivamente.

El porcentaje de la suma de crocinas *trans* (18,95; 18,43 y 17,46%) fue decreciendo levemente. La concentración de las formas *trans* de los ésteres, mayor del 83% del total de crocinas, contribuye a aumentar el efecto bioactivo (del Campo y col., 2010). El porcentaje de la relación de crocinas *trans/cis* fue variable, pero permaneció siempre alrededor del 16,5%.

Durante el proceso de deshidratación de los estigmas del azafrán se producen importantes cambios físicos y químicos todavía no explicados en la literatura (Campo, 2010). Nuestro azafrán muestra haber tenido un buen tratamiento de deshidratación, a temperaturas medias y altas, impidiendo las hidrólisis, por acción de las glucosidasas, presentes en el estigma, lo que incrementa la concentración de las *trans*-4-GG y decreciendo las formas *trans*-3-Gg y *trans*-2-g y las formas *cis* (Campo, 2010). Las crocinas *cis* con respecto a las *trans* tienen un punto de fusión más bajo (Speranza y col., 1984) y tardan más tiempo en degradarse que las *trans* (Sánchez y col., 2008), tienen menor punto de fusión y presentan menor efecto bioactivo. Hay que considerar que las crocinas forman agregados moleculares y que con el tiempo estos aumentan de tamaño (Serrano y col., 2011), para poder explicar los cambios de concentración de algunas crocinas.

Se demuestra que hay una mayor relación de ésteres *trans* frente a los *cis* lo que contribuye a una mayor fuerza colorante y efecto bioactivo. (Campo, 2010) y asegura la bioactividad.

Hay algunas evidencias de que los tres tipos de compuestos mayoritarios, crocinas, picrocrocina y sus compuestos volátiles relacionados pueden estar intercorrelacionados, así que las crocinas podrían generar picrocrocina, safranal y otros compuestos volátiles (Carmona y col., 2007).

Podríamos concluir que la calidad final de la especia, y por tanto su contenido en compuestos, se mantiene sin grandes variaciones que pudieran considerarse pérdida de efectos bioactivos del azafrán. El envasado ha podido contribuir a preservar las mejores condiciones de conservación en ausencia de luz y humedad. De acuerdo con los resultados obtenidos puede considerarse estable en composición y efectos bioactivos.

### **4.3. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL AZAFRÁN SOBRE EL ESTADO NUTRICIONAL**

Los enfermos de EM presentan una mayor prevalencia de malnutrición frente a otras enfermedades crónicas (Sorgun y col., 2014) y un deficitario estado nutricional que puede estar relacionado con una mayor actividad de la enfermedad (Flegal y col., 1998; Slawta y col., 2003; Snook y col., 2005; Khuram y col., 2009; Saka y col., 2012).

Los factores que condicionan la EM y las comorbilidades que la acompañan, unido a la dificultad para obtener los alimentos, su preparación, ingesta, y el proceso fisiológico de la digestión y absorción de nutrientes pueden incrementar el riesgo nutricional de estos pacientes (Posner y col., 1993; Fishman, 1994).

Para la estimación global del riesgo nutricional se estudiaron los parámetros bioquímicos de los pacientes, se realizaron determinaciones antropométricas y 3 cuestionarios dietéticos: “Conozca su salud nutricional” (CSSN), cuestionario de frecuencia de consumo (CFC) y recuerdo de 24 horas.

#### **4.3.1. Influencia de la intervención nutricional en parámetros bioquímicos**

La *Tabla 19* muestra los resultados de los parámetros bioquímicos de la población estudiada, antes y después de la ingesta de infusión de azafrán.

Todos los parámetros estudiados en estos pacientes se encontraron dentro de los valores normales de referencia, tanto al inicio como al final del estudio. La analítica en sangre de la bioquímica estándar no es una buena herramienta para el

diagnóstico de la EM, aunque pueda ser de ayuda para el diagnóstico diferencial de otras enfermedades autoinmunes, como lupus eritematoso, síndrome de Sjögren primario; de enfermedades infecciosas como la brucelosis que enmascaran la EM (Fernández y col., 2005; Lublin y col., 2014). El fluido útil para el diagnóstico de la EM es el líquido cefalorraquídeo (LCR) pues presenta hallazgos característicos en más del 90% de los pacientes (Fernández y col., 2005; Freedman y col., 2005; Prieto y Yuste, 2015).

Tabla 19. Descripción de los parámetros bioquímicos de la población estudiada antes y después de la ingesta de infusión de azafrán

	<b>Antes media (DE)<sup>a</sup></b>	<b>Después media (DE)</b>	<b>Valores normales de referencia</b>
Glucosa (mg/ dL)	88,06 (8,53)	85,94 (7,19)	74-109
Urea (mg/dL)	33,48 (7,36)	31,71 (7,49)	74-110
Creatinina (mg/dL)	0,73 (0,17)	0,72 (0,13)	0,5-1,2
Ácido úrico (mg/dL)	4,41 (1,02)	4,34 (0,89)	2,4-7
Calcio (mg/dL)	9,36 (0,26)	9,33 (0,17)	8,6-10,2
Sodio (mmol/L)	141,92 (2,11)	142,08 (2,11)	135-145
Potasio (mmol/L)	4,54 (0,36)	4,66 (0,37)	3,5-5,1
Cloro (mmol/L)	103,50 (2,17)	103,00 (2,31)	98-107
Hierro (µg/dL)	83,33 (7,10)	107,00 (26,89)	37-158
<b><i>Perfil hepático</i></b>			
Fosfatasa alc (U/L)	67,90 (18,43)	70,50 (26,42)	35-129
GOT (U/L)	19,10 (4,87)	19,59 (5,58)	35-130
GPT (U/L)	19,29 (6,57)	23,48 (10,96)	35-131
GGT (U/L)	27,57 (20,59)	30,57 (25,41)	35-132
<b><i>Perfil lipídico</i></b>			
Colesterol (mg/dL)	206 (29,15)	190,91 (20,60)	150-200
Triglicéridos(mg/dL)	110,33 (77,54)	93,33 (41,67)	50-200
HDL-col (mg/dL)	56,57 (12,42)	60,14 (16,34)	35-65
LDL-col (mg/dL)	124,86 (35,76)	115,86 (27,04)	50-130

<sup>a</sup> Valores presentados como la media (desviación estándar)

El valor medio de la glucosa fue de 88,06 y 85,94 mg/dL, antes y después de la intervención, respectivamente (*Tabla 19*). Los valores de glucosa se encontraron dentro de los valores normales lo que indica el correcto funcionamiento del metabolismo oxidativo de los hidratos de carbono ingeridos en la dieta y reduce considerablemente el riesgo de desarrollar complicaciones (Prieto y Yuste, 2015). Otros estudios en pacientes de EM han reflejado resultados similares a los aquí obtenidos (Saka y col., 2011; Mahler y col., 2012; Rangel y col., 2014). Algunos autores afirman que los niveles de glucosa no están más elevados en enfermos de EM y que existe una correlación positiva entre la glucosa en plasma y la escala de estado de discapacidad ampliada (EDSS) y tasa de recaída clínica (Sternberg y col., 2013).

La inactividad física de estos pacientes, en fases avanzadas de la enfermedad, está asociada a un aumento del riesgo del síndrome metabólico: hipertensión, dislipidemia, concentraciones elevadas de glucosa y obesidad. Aunque los estudios no son concluyentes, hay numerosas evidencias que muestran que los pacientes con EM son más propensos a tener enfermedades cardiovasculares o factores de riesgo del síndrome metabólico. Muchos pacientes con síndrome metabólico también presentan resistencia a la insulina, lo que supone un aumento del riesgo de desarrollar diabetes tipo II, que a su vez influye en cardiopatías cardiovasculares. Algunos estudios sugieren que en pacientes de EM hay una disminución de la sensibilidad a la insulina con hiperinsulinemia postprandial (Corcoran, 2007; Penesova y col., 2015). Kang y col., (2010) refieren una mayor prevalencia de diabetes tipo II en pacientes con EM debido a los niveles elevados de glucosa, asociados a la falta de movilidad y a la resistencia a la insulina que se ocasiona en estados avanzados de la enfermedad.

La influencia de la ingesta de azafrán sobre la glucemia se ha observado en algunos estudios in vivo que constataron una disminución de los niveles de glucosa en sangre de ratas con diabetes mellitus experimental, tras la administración de un extracto de azafrán (Shirali y col., 2013; Samarghandian y col., 2014), pero en estudios con humanos esta disminución no ha sido demostrada.

Los valores medios de urea fueron 33,48 y 31,71 mg/dL, antes y después de la intervención (*Tabla 19*) y se encontraron dentro de los valores de referencia normales. La concentración plasmática de urea puede aumentar con la ingestión de proteínas y con la administración de corticoides, medicación utilizada en el tratamiento de los brotes de EM. Además, la oliguria, hipotensión o la enfermedad renal también aumentan su concentración. Por el contrario una dieta baja en proteínas y un estado de poliuria disminuyen la urea en plasma (Prieto y Yuste, 2015).

Los valores de creatinina obtenidos en este estudio no mostraron cambios significativos, siendo las concentraciones 0,73 y 0,72 mg/dL, antes y después, cifras dentro de los valores normales de referencia. La producción de creatinina es proporcional a la masa muscular y en consecuencia un valor bastante constante a lo largo del día, aunque puede modificarse a largo plazo. Las mujeres tienen generalmente niveles más bajos de creatinina debido a su menor masa muscular y también en pacientes de EM es muy frecuente que presenten poca masa muscular debido a la dificultad para deambular y al catabolismo del músculo esquelético por el uso prolongado de glucocorticoides (Dionyssiotis, 2013). Nuestros resultados no difieren con los bajos niveles de creatinina en plasma encontrados en el estudio de Aksungar y col. (2008) en 42 pacientes de EM (0,84 mg/mL). Hay autores que indican que los tratamientos con interferon-beta, a los que están sometidos estos enfermos, pueden elevar los niveles de creatinina y urea (Tavakoli y col., 2012).

Los datos obtenidos en este estudio muestran que los niveles de ácido úrico están dentro de los valores normales, 4,41 y 4,34 mg/dL, antes y después de la ingesta de la infusión de azafrán, respectivamente (*Tabla 19*) y no presentaron diferencias significativas. Estos valores son similares a los obtenidos por Hooper y col., (1998), Toncev y col., (2002), Liu y col., (2012) en pacientes con EM. La literatura no es concluyente con los valores de este parámetro, si bien algunos autores consideran la disminución de niveles de ácido úrico, resultado del catabolismo de las purinas, un biomarcador de la EM (Langemann y col., 1992; Kutzing y Firestein, 2008; Amorini y col., 2009; Tavazzi y col., 2011), otros le

atribuyen el efecto contrario (Karg y col., 1999; Mostert y col., 2005; Ramsaransing y col., 2005).

Un estudio realizado con 141 pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente (EMRR) puso de manifiesto que los niveles de ácido úrico se reducen durante el curso de la evolución de la enfermedad, sugiriendo una disminución de las reservas de antioxidantes, frente al riesgo de brotes, progresión de la discapacidad y función cognitiva (Moccia y col., 2015a; Moccia y col., 2015b). Algunos autores atribuyen efecto neuroprotector a los altos niveles de ácido úrico en enfermos de gota y otras patologías, frente a las enfermedades neurodegenerativas (Abraham y col., 2014; Pakpoor y col., 2015). En otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y Alzheimer también se han encontrado niveles bajos de ácido úrico (NINDS, 2015).

La *Tabla 19* refleja los resultados de los componentes iónicos del plasma: calcio, sodio, potasio y cloro, principales responsables de la presión osmótica, junto a la glucosa y la urea. El organismo los precisa para realizar numerosas funciones y el mantenimiento del equilibrio hídrico. El calcio es necesario para la contracción muscular, la transmisión del impulso nervioso, la secreción hormonal, la función cardíaca y la coagulación sanguínea. El sodio contribuye al mantenimiento de una relación adecuada entre la cantidad de agua y sales minerales del organismo. El potasio es necesario para la actividad de los enzimas, además de tener una importante acción en la contracción cardíaca y muscular, por lo que su concentración plasmática debe mantenerse dentro de unos valores concretos. El cloro, fundamental para el equilibrio ácido-base, varía en la misma dirección del sodio. La hipocloremia puede obedecer a vómitos, diarreas o situaciones de deshidratación (Prieto y Yuste, 2015).

El calcio se mide por su concentración sérica, que incluye la fracción unida a albúmina y el calcio iónico. Las cifras observadas de calcio estuvieron dentro de los valores normales, 9,36 y 9,33 mg/dL sin apreciarse cambios significativos entre antes y después de la ingesta de azafrán. Estos resultados difieren de los

obtenidos en otros estudios que encontraron niveles más bajos de calcio en los enfermos de EM frente a los controles (Aksungar y col., 2008).

Los valores medios del resto de iones, antes y después, fueron: 141,92 y 142,08 mmol/L de sodio; 4,54 y 4,66 mmol/L de potasio; 103,5 y 103 mmol/L de cloro, respectivamente, todos dentro del rango de referencia (*Tabla 19*). Otros estudios muestran datos semejantes de valores de normalidad en pacientes de EM (Tavakoli y col., 2012), aunque, Kleinewietfeld y col. (2013), asociaron niveles elevados de cloruro sódico con neuroinflamación.

Los resultados de los valores de hierro muestran un aumento de los valores medios, tras la ingesta del azafrán, de 83,33 µg/dL a 107 µg/dL, aunque sin diferencias significativas. El hierro es un oligoelemento necesario para la síntesis de la hemoglobina y de numerosas proteínas celulares. Además es imprescindible en el desarrollo del sistema nervioso central y el correcto metabolismo de las neuronas y la mielinización (Kell, 2009; Youdim y col., 2000). Un déficit de hierro podría comprometer las necesidades de los oligodendrocitos para cubrir los altos requerimientos energéticos necesarios para la biosíntesis de mielina (Todorich y col., 2009). La deficiencia de hierro de las mujeres podría explicar el mayor número de casos de EM en mujeres que en hombres (Warren y col., 2008). Sternberg y col. (2013) encontraron niveles normales de hierro en pacientes con EM Sin embargo en pacientes con EM activa se observaron niveles séricos de hemoglobina y hierro dentro de los valores normales pero de transferrina soluble elevados, lo que indica mayor actividad metabólica del hierro, índice de la inflamación activa presente en estos pacientes (Sfagos y col., 2005).

Se ha relacionado la deficiencia de hierro como causa de anormalidad en la actividad endocrina e inmunitaria (Kuvibidila 1987). Van Toorn y col. (2010) asociaron niveles bajos de hierro en niños y la presencia de episodios de desmielinización, debido a la importancia de éste para la supervivencia de los oligodendrocitos y la mielina. La regulación del hierro puede contribuir a mejorar el metabolismo neuronal (Abo-Krysha y Rashed, 2008) .

La *Tabla 19* nos muestra los valores de los parámetros utilizados para evaluar la funcionalidad hepática. La aspartato aminotransferasa (AST/GOT) y la alanino aminotransferasa (ALT/SGPT) son enzimas que intervienen en el metabolismo proteico e indicadores de citolisis o daño tisular hepático. La AST aumenta de forma significativa con el ejercicio físico y el daño muscular. Aumentan un 40-50% en personas obesas y no varían habitualmente con las comidas. La fosfatasa alcalina es una enzima implicada en el transporte de metabolitos a través de las membranas. Aumenta con la ingesta y el aumento de peso y no se modifica con el ejercicio. La GGT (gammaglutamiltranspeptidasa) es útil para determinar el origen hepático de la elevación de la fosfatasa alcalina.

Las cifras de enzimas hepáticas en plasma se encontraron dentro de los valores normales de referencia tanto al inicio como al final del estudio: 67,9 y 70,5 U/L de fosfatasa alcalina; 19,1 y 19,59 U/L de GOT; 19,29 y 23,48 U/L de GPT y 27,57 y 30,57 U/L de GGT. Estas concentraciones reflejan la destrucción habitual de las células que las contienen, sin embargo, su alteración indicaría inflamación hepática (Travé i Mercadé, 2015). Hay que tener en cuenta que los tratamientos de EM con metilprednisolona a altas dosis e interferón beta a dosis frecuentes, pueden generar toxicidad hepática (Francis y col., 2003; Rivero y col., 2008; Chan y col., 2010) que se pondría de manifiesto con valores elevados de dichas enzimas hepáticas lo que obligaría a la supresión del fármaco (García Merino y Blasco, 2007). Esta situación no se observa en nuestro estudio.

La administración de azafrán y/o crocinas en ratones mejoró los parámetros bioquímicos hepáticos, atribuyéndole actividad protectora sobre la hepatotoxicidad, anteriormente provocada con cloruro de aluminio (Shati y col., 2010; Asdaq y col., 2010).

Con respecto a los parámetros que representan el perfil lipídico, el interés de la medición del colesterol y triglicéridos viene dado porque su concentración plasmática en niveles elevados es un factor de riesgo cardiovascular (Prieto y Yuste, 2010). Además, el metabolismo del colesterol es importante en el

mantenimiento de la mielina y las membranas neuronales en el SNC. Las concentraciones en plasma de metabolitos específicos del colesterol cerebral son posibles marcadores de neurodegeneración (Bandaru, 2014). El colesterol juega un papel modulador de la respuesta inmune y algunos estudios proponen el uso de las estatinas, que actúan como inhibidores de la síntesis del colesterol, como agentes inmunomoduladores debido a su potente efecto sobre los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos (Ulivieri, 2014; Malfitano, 2014). Los resultados de nuestros pacientes muestran la media del colesterol total inicial (206 mg/dL), ligeramente elevada al inicio del estudio, disminuyó a 190,91 mg/dL tras la toma de la infusión de azafrán, cifra dentro de los valores normales de referencia. También se observa una ligera disminución tras la toma de la infusión de azafrán en el nivel de triglicéridos pasando de 110,33 mg/dL a 93,33 mg/dL, y en el de LDL-colesterol inicialmente a 124,86 mg/dL y tras la ingesta 115,86 mg/dL. Por el contrario, el HDL colesterol aumentó de 56,57 a 60,14 mg/dL (*Tabla 19*). Si bien tras la ingestión de la infusión de azafrán no se encontraron diferencias significativas con los parámetros lipídicos, los resultados apuntan una tendencia de mejora del perfil lipídico, aunque se debería verificar en estudios posteriores con mayor número de pacientes.

Niveles elevados de LDL-colesterol se correlacionan con lesiones observadas a través de RMN en pacientes con EM, (Jamroz-Wisniewska y col., 2009) lo que pone de manifiesto la asociación de perfiles lipídicos adversos con empeoramiento en la valoración del EDSS, discapacidad, progresión de discapacidad y enfermedad en pacientes con EM (Giubilei y col., 2002).

Se asocia un valor HDL-colesterol elevado con una disminución de la inflamación (Weinstock-Guttman y col., 2011) y mayor riesgo de progresión de la discapacidad con aumento de triglicéridos (Comoglu y col., 2004) y bajos niveles de HDL-colesterol (Rangel y col., 2014). Sin embargo, otros estudios no encuentran asociación entre el perfil lipídico y riesgo de recaídas (Tettey, 2014) y consideran que no hay diferencias entre el perfil lipídico de estos enfermos y el grupo control (Salemi y col., 2010; Saka y col., 2011).

Hay literatura científica que sugiere el efecto beneficioso del azafrán sobre el perfil lipídico, ayudando a reducir el riesgo cardiovascular, manteniendo la salud de las arterias y vasos sanguíneos. Los efectos son atribuidos al azafrán especia, crocetina y/o crocinas (Zheng y col., 2005; Kamalipour y col., 2011).

Una revisión acerca de los efectos cardiovasculares del azafrán muestra que éste ayuda a disminuir los niveles de colesterol, manteniéndolo dentro de los niveles normales (Kamalipour y col., 2011). Además, los antioxidantes presentes en una infusión de azafrán pueden contribuir a mejorar el sistema circulatorio (Verma y Bordia, 1998; Xiang y col., 2006). Hay evidencias de que las crocinas pueden disminuir los niveles de triglicéridos, colesterol total y LDL colesterol y aumentar el HDL colesterol (He y col., 2005; Xu et al., 2005).

El estudio de Zheng y col. (2005) si bien no encontró diferencias en los niveles lipídicos en plasma de conejos, sí observó una significativa disminución de los depósitos de colesterol en aorta, placas de ateromas y lesiones ateroscleróticas en el grupo que le suministró crocetina. Un estudio posterior del mismo grupo, evaluando el efecto de las crocinas en ratas, observó la disminución en el suero de triglicéridos, colesterol total y LDL, así como un incremento significativo de la excreción de grasa fecal y colesterol (100 mg/kg/día). El posible mecanismo sugerido es la inhibición de la lipasa pancreática lo que provocaría una menor absorción de lípidos (Sheng y col., 2006). Asdaq y col. en 2009, constataron que el azafrán tiene mayor efecto hipolipemiante que la crocina.

Samarghandian y col. (2014) afirman que un extracto de azafrán incrementa los niveles de HDL y disminuye el colesterol, triglicéridos y LDL, después de 28 días de tratamiento, en ratas a las que se indujo diabetes mellitus experimental. Así mismo, Shirali y col. (2013) ensayaron el efecto de la crocina en ratas diabéticas con el resultado de bajada de peso y una disminución de los niveles séricos de triglicéridos, colesterol total y LDL; por el contrario, las HDL se incrementaron. Un estudio en ratas y ratones, sobre la toxicidad aguda y subaguda del safranal muestra en el análisis bioquímico, que tras 21 días de administración hay una

significativa disminución del colesterol, triglicéridos y fosfatasa alcalina (Hosseinzadeh y col., 2013).

#### 4.3.2. Influencia de la intervención en parámetros antropométricos

En la *Tabla 20* se recogen los resultados de las medidas antropométricas de la población estudiada antes y después de la ingesta de infusión de azafrán.

La talla media de los pacientes fue de 167 cm. Los resultados de los diámetros corporales fueron 8,74 cm en diámetro bicondilar y 5,79 cm en diámetro biepicondilar. El peso medio fue 69,27 Kg, al inicio del estudio y tras la intervención el valor medio del peso fue 69,96 Kg, sin demostrar diferencias significativas.

Los valores de las circunferencias corporales tampoco evidencian diferencias significativas. La circunferencia del brazo antes de la intervención fue 29,42 cm y tras la misma 29,48 cm; la circunferencia del brazo flexionado 31,46 y 31,21 cm; la circunferencia de cintura 87,27 y 89,68 cm; la circunferencia de cadera 102,44 y 103,25 cm, respectivamente antes y después (*Tabla 20*). Los valores de la circunferencia de cintura son un factor de riesgo cardiovascular cuando son  $\geq$  a 88 cm y 102 cm, en mujeres y hombres respectivamente, según criterio de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Separando la población de nuestro estudio por sexos encontramos, que el porcentaje de mujeres que supera el valor de referencia es 38,46% y el de hombres 27,27%. Estos valores no sufrieron variación significativa tras la intervención nutricional. La circunferencia de cintura se ha propuesto en las personas de edad avanzada como mejor indicador de adiposidad que el IMC y un buen predictor de riesgo vascular y morbilidad (Garnett y col., 2007; Luchsinger y col., 2007). Algunos estudios indican que el incremento de 1 cm en la circunferencia de la cintura está asociado a un aumento del 2% de probabilidades de padecer complicaciones cardiovasculares (De Koning y col., 2007).

Tabla 20. Descripción de los valores antropométricos de la población estudiada antes y después de la ingesta de azafrán

	Antes media (DE) <sup>a</sup>	Después media (DE)	p-valor
<b>Peso (kg)</b>	69,27(12,41)	69,96(11,06)	
<b>Talla (cm)</b>	167,00(10,43)	167,25(10,54)	
<b>Diámetros corporales</b>			
Bicondilar (cm)	8,74 (0,81)	8,34 (0,88)	
Biepicondilar (cm)	5,79 (0,57)	5,84 (0,61)	
<b>Circunferencias corporales</b>			
Brazo (cm)	29,42 (4,26)	29,48 (3,13)	
Brazo flexionado (cm)	31,46 (4,81)	31,21 (2,98)	
Cintura (cm)	87,27 (11,17)	89,68 (11,60)	
Cadera (cm)	102,44 (5,51)	103,25 (6,26)	
Pierna (cm)	37,62 (4,27)	37,56 (2,67)	
<b>Pliegues subcutáneos</b>			
Tricipital (mm)	21,04 (5,69)	17,56 (5,79)	0,001*
Subescapular (mm)	17,71 (6,58)	18,17 (6,52)	
Supraespinal (mm)	26,06 (9,25)	20,00 (7,23)	0,003*
Pierna (mm)	18,23 (7,37)	16,33 (4,60)	
GC <sup>b</sup> .(tric+subesc)(%)	27,53 (5,56)	26,40 (6,17)	
GC <sup>b</sup> .(tric) (%)	27,65 (5,87)	25,17 (5,70)	0,004*
GC <sup>b</sup> .(subesc)(%)	25,81 (6,16)	26,55 (7,57)	
GC <sup>b</sup> .(impedancia)(%)	32,34 (10)	33,58 (6,98)	
<b>Índices antropométricos</b>			
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	25,04 (3,37)	24,89 (2,94)	
Relación cintura/cadera	0,85 (0,08)	0,86 (0,08)	
DC <sup>c</sup> (tric+subesc)(g/ml)	1,04 (0,01)	1,05 (0,05)	
DC <sup>c</sup> (tric) (g/ml)	1,04 (0,01)	1,05 (0,02)	0,004*
DC <sup>c</sup> (subesc) (g/ml)	1,04 (0,01)	1,04 (0,01)	
Superficie muscular brazo (cm <sup>2</sup> )	34,83 (18,60)	39,47 (14,48)	
Masa muscular total (Kg)	20,97 (9,18)	23,37 (7,72)	
Masa muscular total (%)	30,18 (13,61)	33,17 (9,32)	

<sup>a</sup> Valores presentados como la media (desviación estándar);<sup>b</sup> GC=Grasa corporal; <sup>c</sup> DC=Densidad corporal \*p valor=Significación. asintótica (bilateral). Prueba de Wilcoxon Diferencias significativas entre antes y después para p<0,05

La circunferencia de la pierna es un buen indicador de masa corporal muscular, especialmente cuando hay menor actividad física, porque las piernas tienen más de la mitad de la masa muscular del cuerpo (Chumlea, 2006). En la población estudiada los valores medios fueron similares antes y después de la ingesta, 37,62 y 37,56 cm respectivamente (*Tabla 20*).

Los pliegues subcutáneos han sido ampliamente utilizados para estimar la grasa corporal, y algunos de ellos han demostrado ser superiores a otras medidas de grasa corporal en discapacitados físicos y en personas mayores (Becerra, 2006). La medición del porcentaje de grasa corporal se calcula a partir de las medidas de espesor de los pliegues cutáneos y de ella se deduce la grasa corporal total, mediante fórmulas de regresión. El porcentaje de grasa corporal es un factor predisponente de algunas enfermedades.

Los resultados de la *Tabla 20* reflejan los valores medios de pliegues subcutáneos. El espesor del pliegue tricipital tuvo un valor medio inicial de 21,04 mm y tras las 13 semanas de intervención se obtuvo un valor de 17,56 mm ( $p < 0,05$ ) y el valor medio del pliegue supraespinal también disminuyó de 26,06 a 20 mm ( $p < 0,05$ ). El resto de pliegues no presentaron diferencias significativas, siendo el pliegue subescapular de 17,71 mm y 18,17 mm; y el pliegue de la pierna de 18,23 mm a 16,33 mm.

El porcentaje de grasa corporal, tricipital más subescapular no presentó diferencias significativas, con un valor al inicio de 27,53% y 26,4% tras la ingesta de infusiones de azafrán. Tampoco se encontraron diferencias en el porcentaje de grasa corporal subescapular, 25,81% y 26,55%, antes y después, respectivamente; sin embargo el porcentaje de grasa corporal tricipital sí presentó diferencias significativas antes 27,65% y después 25,17 de la intervención ( $p < 0,05$ ).

Los porcentajes de grasa corporal medidos mediante bioimpedancia eléctrica muestran unos valores de 32,24% y 33,58%, antes y después de la intervención (en mujeres 32,51% y 35,62% y en hombres 30,57% y 30,24%). Estos

resultados superan los intervalos de normalidad recomendados por la OMS para la población general (15-20%), pero no se encuentran diferencias significativas entre el antes y después de la intervención. Los porcentajes obtenidos de grasa corporal mediante bioimpedancia eléctrica, antes y después de la intervención, fueron superiores a los determinados utilizando la medición del pliegue tricipital, resultando en este caso una disminución significativa de la grasa corporal tras la intervención nutricional. Esto pone de manifiesto la importancia de combinar varias medidas en la determinación de la grasa corporal.

El índice de masa corporal (IMC), indicador de malnutrición, también mostró valores similares antes y después, 25,04 y 24,89 (kg/m<sup>2</sup>), respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de los valores normales, pero próximos al rango de sobrepeso (25 kg/m<sup>2</sup>), establecido por la OMS, lo que podría conllevar asociado riesgo cardiovascular y comorbilidades como diabetes tipo 2, hipertensión e hipercolesterolemia (Khurana y Bal., 2009; Pilutti y col., 2012).

El umbral actual de IMC para clasificar la obesidad subestima la verdadera adiposidad, pues no distingue entre masa grasa y masa libre de grasa (Martín-Moreno y col., 2003). Hay estudios que afirman, en base al IMC, que los pacientes con EM tienen tasas más bajas de obesidad y sobrepeso que la población general. De forma contradictoria, se encuentran valores más altos de circunferencia de cintura en pacientes de EM, lo que sugiere que el IMC inferior puede ser engañoso en términos de riesgo para la salud (Pinhas-Hamiel y col., 2015).

Un IMC elevado, en edades tempranas, podría estar asociado a un aumento considerable del riesgo de padecer EM en la edad adulta (Munger y col., 2009; Alschuler y col., 2012; Hedström y col., 2012; Mokry y col., 2016). Oliveira y col. (2014), atribuyen una correlación positiva entre IMC y discapacidad. Otros autores no encuentran asociación entre el IMC y una mayor actividad de la enfermedad (Bove y col., 2013). La asociación entre obesidad y actividad física de la EM no está suficientemente estudiada. Wesnes y col., (2018), en un estudio caso control, encontraron una asociación inversa entre una alta actividad física en la

adolescencia y el riesgo de padecer EM, sin diferencias entre áreas geográficas ni por sexo.

Hay estudios que consideran que los cambios en el metabolismo, tras el comienzo de la enfermedad, o la atrofia muscular, resultado de la disminución de la actividad muscular causada por el deterioro neurológico, son responsables de un IMC más bajo en estos pacientes frente a los de otras patologías y la población general (Formica y col., 1997; Norverdt y col., 2005; Sioka y col., 2011; Alschuker y col., 2012).

El índice cintura/cadera es un indicador antropométrico específico para medir niveles de grasa intraabdominal, asociada a un aumento de riesgo cardiovascular y a la probabilidad de desarrollar diabetes mellitus e hipertensión arterial. La OMS establece unos niveles normales de 0,8 en mujeres y 1 en hombres. Los valores obtenidos en el estudio no mostraron variación en la relación cintura/cadera, 0,85 antes y 0,86 después, valores que se encontrarían dentro de la normalidad (*Tabla 20*). Separando la población por sexos, los valores obtenidos fueron 0,81 y 0,82 en mujeres, y 0,87 y 0,92 en hombres, antes y después de la intervención nutricional, observando que las mujeres superan el índice de riesgo cardiovascular y no los hombres.

Debe considerarse que las comorbilidades van aumentando en los pacientes de EM a medida que la enfermedad progresa, aumenta la dificultad en la movilidad y consecuentemente, hay una reducción del gasto energético y actividad física en pacientes, lo que puede resultar en la acumulación de grasa abdominal (Wens y col., 2013).

La *Tabla 20* muestra los resultados de masa muscular total en kilogramos, 20,97 y 23,37 kg y en porcentaje, 30,18 y 33,17%, antes y después de la ingesta de azafrán respectivamente. La masa muscular, o masa libre de grasa, se determina a partir de la circunferencia del brazo y el pliegue tricipital. El tamaño del músculo del brazo, determinado por el área muscular del brazo, es un indicador de las

reservas proteicas. Hay pocos estudios que comparen la masa libre de grasa entre pacientes de EM y grupos control y la mayoría de estos no muestran diferencias significativas (Wens y col., 2013).

En resumen, el IMC, aunque presentó valores similares al finalizar la intervención, se encuentra al límite del sobrepeso. Los valores de la circunferencia de la cintura no muestran diferencias antes y después y son próximos a los valores considerados por la OMS de riesgo cardiovascular, siendo mayor el porcentaje de mujeres que el de hombres que supera el valor de referencia. Por otro lado el índice cintura/cadera no presentó cambios y se encontró dentro de la normalidad, observando, al separar por sexos que las mujeres superan el índice de riesgo cardiovascular y no los hombres. Los resultados no muestran diferencias entre la masa muscular antes y después de la ingesta de azafrán. Por el contrario sí se encontraron diferencias de la acumulación de grasa en dos pliegues, el tricipital y el supraespinal, con la consecuente disminución de la grasa corporal y densidad corporal tricipital.

#### **4.3.3. Influencia de la intervención nutricional en el consumo de alimentos**

Las consideraciones nutricionales son fundamentales para evitar la malnutrición que acompaña a las enfermedades neurológicas (Mahan y col., 2012). La malnutrición, por exceso o por déficit, de macronutrientes, minerales y vitaminas son factores de riesgo de morbimortalidad. La obesidad se asocia a desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas. En los pacientes de EM la obesidad, una dieta pobre en nutrientes, el tratamiento farmacológico, entre otros factores, pueden ser causantes de la fatiga que afecta hasta un 90% de los enfermos de EM. Los fármacos utilizados para el control de la fatiga, como la amantadina, tienen beneficios limitados en estos enfermos por lo que las modificaciones nutricionales y el estilo de vida, podrían reducir de forma significativa este síntoma (García Merino y Blasco, 2007; Weiland y col., 2015).

Recientes estudios muestran que una intervención nutricional con alimentos antioxidantes y suplementos dietéticos disminuye la síntesis de compuestos

proinflamatorios mejorando la efectividad de fármacos inmunomoduladores y el bienestar de los pacientes de EM (Riccio y Rossano, 2015).

Aunque la influencia de la nutrición sobre el estado inflamatorio y el bienestar de los pacientes de EM no está asociada a ningún tipo de patrón dietético (Riccio y Rossano, 2015), sí hay suficiente evidencia de la relación entre el modelo de consumo alimentario (cantidad y tipo de alimentos) y el desarrollo, prevención y tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas (Salvador y col., 2006).

Además, determinados fármacos utilizados en el tratamiento de la EM influyen en la nutrición de los pacientes. Los corticoides aumentan el apetito, peso, retienen líquidos y producen insomnio y nerviosismo. El metotrexato junto con la ACTH provoca anorexia y náuseas. Cuando la enfermedad avanza pueden aparecer déficits neurológicos y disfagia haciendo necesario la modificación de la consistencia de la dieta de sólidos duros a blandos y líquidos espesos para prevenir la aspiración (Mahan y col., 2012).

Esta tesis evaluó los hábitos alimentarios y variedad de la dieta de pacientes de EM, estimando la ingesta de energía y nutrientes y determinando el porcentaje de aportación de esta ingesta a las recomendaciones de la pirámide de alimentos (SENC, 2007).

El estado nutricional de los pacientes se determinó mediante 3 cuestionarios dietéticos, cuestionario de frecuencia de consumo (CFC), recuerdo de 24 horas y “Conozca su salud nutricional” (CSSN).

### ***Cuestionario de frecuencia de consumo (CFC)***

Se utilizó el cuestionario de frecuencia de consumo (CFC) para obtener la relación de alimentos mediante la cual se pudo estimar el patrón de dieta y cuantificar el consumo de energía y el aporte nutricional de macronutrientes, vitaminas y minerales.

Los hábitos alimentarios y la variedad de la dieta son índices útiles para valorar la calidad de una dieta. La *Tabla 21* refleja la diferencia en el consumo habitual de una serie de alimentos, antes y después de la intervención, expresada como media del número de raciones, obtenida mediante el cuestionario CFC.

La variedad de la dieta es garantía de equilibrio nutricional, pudiendo influir en la prevención, desarrollo y tratamiento de la enfermedad.

Tabla 21. Ingesta media a partir de raciones de alimentos, antes y después de la intervención obtenida del cuestionario CFC

Alimentos/frecuencia	Ingesta media raciones		
	Antes media (DE) <sup>a</sup>	Después media(DE)	p-valor
Cereales/día	2,8 (0,9)	3,5 (1,4)	0,009**
Productos lácteos/día	2,4 (1,4)	2,3 (1,1)	0,048*
Fruta/ día	2,6 (1,1)	2,5 (0,9)	
Vegetales/día	1,2 (0,6)	1,5 (1,2)	
Aceites/día	2,3 (0,6)	2,3 (0,7)	
Carne magra/semana	3,5 (3)	3,3 (3,1)	
Pescado/ semana	4,0 (1,7)	5,0 (1,9)	0,027*
Huevos/ semana	2,6 (0,9)	2,7 (0,7)	
Legumbres/semana	2,4 (1,4)	3,8 (3,5)	0,050*
Frutos secos/semana	3,9 (5,8)	3,0 (4,2)	
Carnes grasas/semana	5,1 (3,2)	4,4 (2,3)	
Dulces/semana	15,2 (10,0)	14,8 (9,5)	
Salsas/semana	3,2 (3,3)	2,9 (2,9)	
Precocinados/semana	0,9 (1,2)	1,2 (1,5)	
Bebidas sin alcohol/semana	2,8 (4,9)	1,8 (2,3)	
Bebidas alcohólicas/semana	0,9 (2,0)	1,8 (3,9)	

<sup>a</sup> Valores presentados como la media (desviación estándar); \*p valor= *Diferencias significativas entre antes y después para* \*p<0,05. \*\*p<0,01. Prueba de Wilcoxon

Tras la evaluación de la frecuencia de consumo se observó un aumento significativo en el consumo diario de cereales ( $p < 0.01$ ) y una disminución del consumo de productos lácteos ( $p < 0.05$ ) tras la intervención. También aumentó la ingesta de legumbres y de pescado ( $p < 0.05$ ), pero no hubo cambios en la ingesta de fruta, vegetales, aceite y de huevos.

Los resultados muestran un menor consumo de carne magra y carne grasa, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Disminuyó el consumo de frutos secos y de bebidas sin alcohol, pero hubo un mayor consumo de alimentos precocinados y bebidas alcohólicas y aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, el consumo de dulces y salsas fue menor tras la intervención.

Los pacientes de EM deberán llevar una dieta equilibrada y variada, tipo dieta mediterránea, con las modificaciones que requieran este tipo de pacientes. Hay autores que consideran que el consumo de gluten debe ser limitado y aconsejan aumentar el consumo de cereales integrales (Ricchio y Rossano, 2015). Además, hay que resaltar que un patrón dietético alto en grasas animales, productos cárnicos, grasas hidrogenadas y azúcares, y bajo en granos enteros, está relacionado con una mayor prevalencia en EM (Jahromi y col., 2012). Se recomienda evitar la ingesta de refrescos azucarados, leche entera, mantequilla, quesos grasos, carnes grasas, embutido y bollería (Hernández y col., 2015).

Las Guías Alimentarias para la Población Española, elaboradas por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) marcan las recomendaciones dietéticas para promover una alimentación saludable. La dieta debe ser equilibrada, variada y moderada en el tamaño de las raciones. La dieta mediterránea es un buen patrón alimentario, pues incluye cereales de grano entero, frutas, verduras, legumbres, cantidades variables de lácteos y alterna el consumo de pescados, huevos y carnes magras, junto con el uso preferente de aceite de oliva virgen extra como grasa culinaria.

El porcentaje de pacientes que cumplía las recomendaciones de frecuencia de consumo por grupos de alimentos y su relación con las raciones recomendadas en la pirámide de la alimentación saludable (SENC, 2016), antes y después de la intervención, se refleja en la Tabla 22. Al inicio del estudio, el porcentaje de pacientes que ingerían un número de raciones inferior al recomendado fue alto respecto al consumo de cereales (91,7%), frutas (66,7%), vegetales (79,2%) y frutos secos (62,5%). Al finalizar el estudio, el porcentaje de la población estudiada que cumplía las recomendaciones de raciones de alimentos, aumentó respecto al consumo de cereales, legumbres y vegetales, lo que puede suponer un beneficio en estos enfermos, pues la mayoría de ellos son fuente de fibra vegetal, cuyo efecto positivo sobre el estreñimiento es especialmente recomendado en estos pacientes, sin embargo el consumo de frutas está por debajo de las recomendaciones, antes y después de la intervención (66,7% y 75%), al igual que la ingesta de aceites vegetales (95,8%).

Además, aumentó el número de pacientes cuyo consumo se ajustaba a las recomendaciones en productos lácteos, pescados, huevos, frutos secos, carnes grasas, azúcares, salsas, bebidas sin alcohol, siendo esta diferencia significativa en el caso de los productos lácteos ( $p < 0,05$ ), carnes grasas y azúcares ( $p < 0,01$ ). Diferentes estudios ponen de manifiesto que una dieta baja en grasas y suplementada con omega 3 provoca mejoría en la EM (Weinstock-Guttman y col., 2005; Jelinek y col., 2013; Rezapour Fioruzi y col., 2013), es por ello que se recomienda el consumo de pescado azul en estos pacientes. También es importante el consumo de carnes como pollo, pavo y ternera. Finalmente, no se observaron diferencias en consumo de alimentos precocinados y bebidas alcohólicas.

Tabla 22. Distribución porcentual de la frecuencia de consumo por grupos de alimentos de la población estudiada y su relación con las raciones recomendadas en la pirámide de alimentación saludable (SENC, 2016), antes y después de la intervención, mediante el cuestionario CFC

	Antes	Después		
	Porcentaje pacientes		Dif	p-valor
<b>Cereales</b>				
<b>(IDR: 4-6 raciones/día)</b>				
inferior	91,7	62,5	29,2	
recomendado	8,3	33	-24,7	
superior	0	4,2	-4,2	
<b>Productos lácteos</b>				
<b>(IDR:2-4 raciones/día)</b>				
inferior	41,7	33,3	8,4	0,023*
recomendado	41,7	54,2	-12,5	
superior	16,7	12,5	4,2	
<b>Frutas</b>				
<b>(IDR: &gt; 3 raciones/día)</b>				
inferior	66,7	75	-8,3	
recomendado	29,2	25	4,2	
superior	4,2	0	4,2	
<b>Vegetales</b>				
<b>(IDR: 2-3 raciones/día)</b>				
inferior	79,2	70,8	8,4	0,001**
recomendado	20,8	20,8	-	
superior	0	8,3	-8,3	
<b>Aceites vegetales</b>				
<b>(IDR: 3-6 raciones/día)</b>				
inferior	95,8	95,8	-	
recomendado	4,2	4,2	-	
superior	0	0	-	
<b>Carnes magras</b>				
<b>(IDR: 3-4 raciones/semana)</b>				
inferior	4,2	16,7	-12,5	
recomendado	91,7	79,2	12,5	
superior	4,2	4,2	-	
<b>Pescados</b>				
<b>(IDR: 3-4 raciones/semana)</b>				
inferior	29,2	70,8	-41,6	
recomendado	16,7	20,8	-4,1	
superior	54,2	8,3	45,9	
<b>Huevos</b>				
<b>(IDR: 3-4 raciones/semana)</b>				
inferior	16,7	12,5	4,2	
recomendado	83,3	87,5	-4,2	
superior	0	0	-	

Tabla 22. (continuación)

	Antes	Después		
	Porcentaje pacientes		Dif	p-valor
<b>Legumbres</b>				
<b>(IDR: 2-4 raciones/semana)</b>				
inferior	33,3	20,8	12,5	
recomendado	62,5	58,3	4,2	
superior	4,2	20,8	-16,6	
<b>Frutos secos</b>				
<b>(IDR: 3-7 raciones/semana)</b>				
inferior	62,5	66,7	-4,2	
recomendado	25	29,8	-4,8	
superior	12,5	4,2	8,3	
<b>Carnes grasas</b>				
<b>(IDR: 1-2 raciones/semana)</b>				
inferior	4,2	4,2	-	0,000**
recomendado	0	12,5	-12,5	
superior	95,8	83,3	12,5	
<b>Azúcares</b>				
<b>(IDR: 1-2 raciones/semana)</b>				
inferior	4,2	4,2	-	0,000**
recomendado	0	4,2	-4,2	
superior	95,8	91,7	4,1	
<b>Salsas</b>				
<b>(IDR: 1-2 raciones/semana)</b>				
inferior	4,2	29,2	-25	
recomendado	8,3	25	-16,7	
superior	87,5	45,8	41,7	
<b>Precocinados</b>				
<b>(IDR: 1-2 raciones/semana)</b>				
inferior	25	54,2	-29,2	
recomendado	29,2	29,2	-	
superior	45,8	16,7	29,1	
<b>Bebidas sin alcohol</b>				
<b>(IDR: 1-2 raciones/semana)</b>				
inferior	54,2	45,8	8,4	
recomendado	8,3	16,7	-8,4	
superior	37,5	37,5	-	
<b>Bebidas alcohólicas</b>				
<b>(IDR: 1-2 raciones/semana)</b>				
inferior	79,2	70,8	8,4	
recomendado	4,2	4,2	-	
superior	16,7	25	-8,3	

Valores presentados como porcentajes. **p valor**= Diferencias significativas entre antes y después para \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ . (Chi cuadrado de Pearson). **inferior**: porcentaje de pacientes con ingesta menor a la recomendada por la pirámide alimentaria. **recomendado**: porcentaje de pacientes con ingesta recomendada por la pirámide alimentaria. **superior**: porcentaje de pacientes con ingesta mayor a la recomendada por la pirámide alimentaria

Los resultados de la ingesta calórica y los porcentajes de macronutrientes, antes y después de la intervención, de los pacientes se reflejan en la Figura 34.

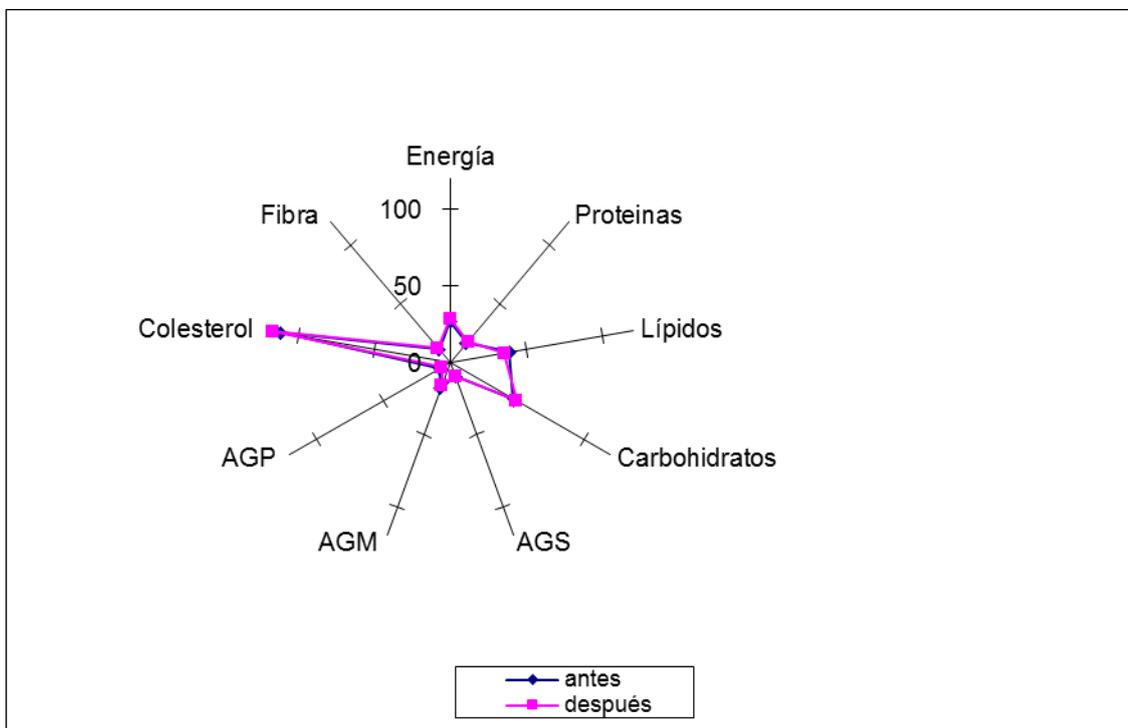


Figura 34. Distribución de los valores medios de la ingesta calórica expresada en Kcal/kg peso; macronutrientes expresados en % de aporte calórico; perfil lipídico, expresado en % de aporte a la ingesta calórica, colesterol (mg/1000 Kcal); y fibra (g/1000Kcal), antes y después de la intervención

La ingesta calórica referida en valores medios, sufrió un ligero aumento, aunque no significativo, de 27 (Kcal/Kg peso) a 28,4 (Kcal/Kg peso). El aporte calórico de los macronutrientes respecto a la energía total de la dieta, no presentó diferencias significativas en proteínas, de 16,4% a 17,8% y carbohidratos, de 47% a 49,3%, antes y después de la intervención. Aunque se observó una disminución en consumo de lípidos (de 38,9% a 35,3%, AGM, de 18% a 15,9%, y AGP, de 7,7% a 6,1%), prácticamente los pacientes estudiados se ajustaron a los objetivos nutricionales (<100mg/1000kcal) (SENC, 2011) e incluso el consumo de fibra aumentó después de la intervención, de 10,9% a 12,5%, acercándose a los valores recomendados, 12-14 g/1000kcal (SENC, 2011) (Figura 34).

El porcentaje de pacientes que se ajustan a los valores de referencia de ingestas diarias recomendadas (IDR), de energía, macronutrientes, perfil lipídico y fibra, antes y después de la intervención nutricional, se reflejan en la *Tabla 23*

Aunque es la valoración conjunta de parámetros dietéticos, antropométricos, bioquímicos y clínicos, la que determina el estado nutricional, si la ingesta de una persona es igual o superior a la IDR, se puede asegurar que es adecuada; si es inferior hay riesgo de ingesta inadecuada.

Tabla 23. Distribución porcentual de la ingesta de energía, macronutrientes, perfil lipídico y fibra de la población estudiada y su relación con las recomendaciones establecidas, antes y después de la intervención, en base al CFC

	Antes	Después	p-valor
	Porcentaje pacientes		
<b>ENERGÍA</b>			
inferior	33	4	
recomendado	46	58	
superior	21	38	
<b>PROTEÍNAS</b>			
inferior	0	0	
recomendado	8	4	
superior	92	96	
<b>LÍPIDOS</b>			
inferior	21	16	
recomendado	46	42	
superior	33	42	
<b>AGS<sup>1</sup></b>			
inferior	26	8	
recomendado	37	42	0,014*
superior	37	50	
<b>AGM<sup>2</sup></b>			
inferior	46	33	
recomendado	37	59	
superior	17	8	
<b>AGP<sup>3</sup></b>			
inferior	33	29	
recomendado	30	42	
superior	37	29	
<b>COLESTEROL</b>			
inferior	37	13	
recomendado	55	83	
superior	8	4	
<b>HC<sup>4</sup></b>			
inferior	46	21	
recomendado	46	50	0,057
superior	8	29	
<b>FIBRA</b>			
inferior	25	17	
recomendado	55	50	
superior	20	33	

Valores presentados como porcentajes. **p valor**= Diferencias significativas entre antes y después para \*p<0,05. \*\*p<0,01. (Chi cuadrado de Pearson). **inferior**: porcentaje de pacientes con ingesta menor a la IDR. **recomendado**: porcentaje de pacientes con ingesta recomendada. **superior**: porcentaje de pacientes con ingesta mayor a la IDR. <sup>1</sup> AGS=Ácidos grasos saturados; <sup>2</sup> AGM= Ácidos grasos monoinsaturados; <sup>3</sup> AGP= Ácidos grasos poliinsaturados; <sup>4</sup> HC= hidratos de carbono

La restricción calórica, el ejercicio y especialmente factores dietéticos, pueden influir en la disminución del estado inflamatorio al actuar sobre el metabolismo celular y la microbiota, por lo que una adecuada intervención nutricional podría ser considerada un tratamiento complementario de la EM (Riccio y Rossano, 2015).

La energía media consumida por los pacientes al iniciar el estudio fue de 1871,2 (Kcal/d) que representaba un 77% de los valores de ingesta diaria recomendada (IDR), calculada de acuerdo a Moreiras y col. (2011), frente a las 1958,8 (Kcal/d) que alcanzaron tras las 13 semanas de toma de infusión de azafrán, que suponían un 90% de las IDR. Esta diferencia de valores medios de energía fue estadísticamente significativa ( $p=0,039$ ) (Figura 35). Según puede observarse en la Tabla 23 el porcentaje de pacientes que no alcanzaba los requerimientos mínimos de las IDR fue el 33%, tras la intervención disminuyó a 4%. A su vez el porcentaje de pacientes que se encontraban en la ingesta recomendada se incrementó de 46% a 58%. Los pacientes que superaban las IDR recomendadas aumentaron de 21% a 38%.

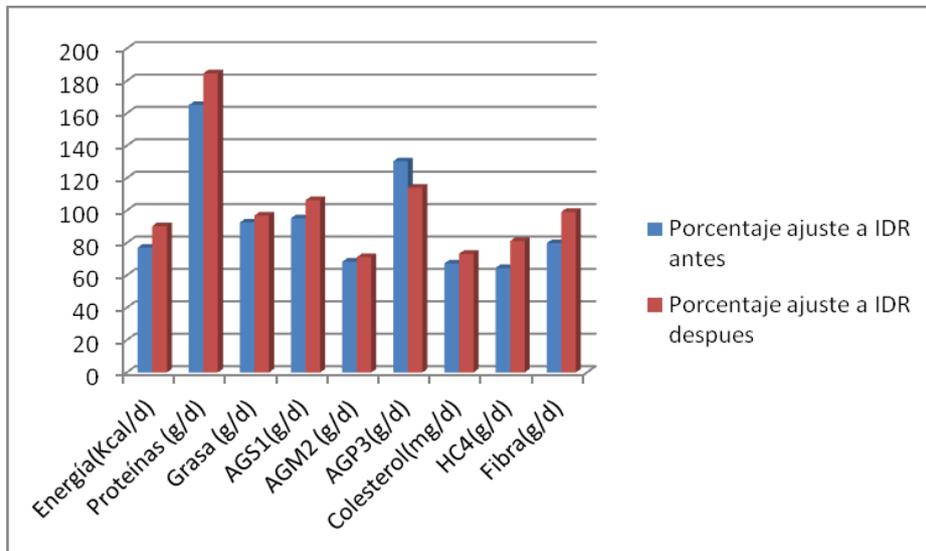


Figura 35. Porcentaje de ajuste a las IDR, de energía, macronutrientes, perfil lipídico y fibra en la población estudiada, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al CFC. 1 AGS=Ácidos grasos saturados; 2 AGM= Ácidos grasos monoinsaturados; 3 AGP= Ácidos grasos poliinsaturados; 4 HC= hidratos de carbono

Del total de energía ingerida, el 50-55% debería proceder de los hidratos de carbono, 10-15% de proteínas y 30-35% de lípidos para una dieta equilibrada según los Objetivos Nutricionales para la población española (Achón y col., 2013). Hay que tener en cuenta que las IDR están calculadas para individuos con cierta actividad física y los pacientes de EM suelen presentar actividad reducida y por tanto necesidades energéticas ligeramente inferiores, por lo que precisarán un menor aporte energético y la misma cantidad de nutrientes.

La proporción de energía procedente de las proteínas fue superior al perfil calórico recomendado, tanto antes como después de la intervención, 16,4% y 17,8% respectivamente, lo que pone de manifiesto la alta ingesta proteica de estos pacientes (Figura 34). El estudio de Saka y col. (2012) mostró un porcentaje dentro de las recomendaciones, 14,6%. La ingesta de proteínas al inicio y tras la intervención fue 76,1 (g/d) y 86,2 (g/d), sobrepasando en ambos casos las recomendaciones dietéticas. Ningún paciente estaba por debajo de los valores recomendados de las IDR, y más del 90% superaban el 100% de las IDR, tanto antes como después (Tabla 23).

Los valores de la ingesta de lípidos fueron 82,4 (g/d) y 76,2 (g/d), antes y después respectivamente, ambos datos próximos al 100% de las IDR (93% y 97%) (Figura 35). El aporte de energía proveniente de los lípidos pasó de un 38,9% a un 35,3% (Figura 34), tras la intervención, resultados semejantes a los observados por Saka y col. (2012). Los lípidos han de cubrir un 30% de la energía total y sobrepasarlo puede suponer un aumento de peso.

Se obtuvieron diferencias significativas en los valores de ácidos grasos saturados (AGS), aumentando el porcentaje de ajuste a las IDR tras la intervención, ( $p=0,004$ ) (Figura 35). Ni los ácidos grasos monoinsaturados (AGM), ni los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) mostraron diferencias con la intervención. La ingesta de AGM presentó un porcentaje de ajuste a las IDR del 68% y del 71%, antes y después respectivamente y en el caso de los AGP superaron el 100% de la IDR (Figura 35). Estos resultados están en consonancia con otros estudios que señalan

valores de lípidos saturados altos y de lípidos monoinsaturados muy inferiores a los recomendados (Mohammad-Shirazi y col., 2007; Saka y col., 2012).

Los AGS provenientes de la alimentación deben de ser controlados para evitar el aumento del proceso inflamatorio en la EM. Una dieta baja en grasas, suplementada con antioxidantes, influye positivamente en la inmunomodulación del metabolismo celular y el proceso de inflamación de la EM. Sin embargo, los AGP podrían reducir la neuroinflamación y el estrés oxidativo por su potente actividad antiinflamatoria y protección frente a enfermedades autoinmunes (Mauritz y col., 2013). Además, una dieta hipocalórica, baja en grasas y rica en AGP, puede atenuar o suprimir la inflamación postprandial, disminuir fatiga y el número de brotes (Weinstock-Guttman y col., 2005; Jelinek y col., 2013; Riccio y Rossano, 2015), generando mejoras significativas en la escala EDSS (Rezapour-Firouzi y col., 2013).

Tampoco hubo diferencias en la ingesta de colesterol. Los pacientes ingerían una media diaria de 201,9 (mg/d) antes y 219,7 (mg/d) después. En ambas situaciones no alcanzaban las IDR (67% y 73%) (*Figura 35*).

Las diferencias de consumo de hidratos de carbono fueron significativas ( $p=0,003$ ), de un 217,9 (g/d), antes de la intervención, a 244,7 (g/d) tras la misma, y en los dos casos por debajo del 100% de las IDR. El aporte energético debido a los hidratos de carbono fue inferior al 50% tanto antes como después, 47% y 49,3%, respectivamente (*Figura 34*). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Saka y col. (2012), donde se observaban valores inferiores a las recomendaciones (46,9%).

La ingesta de fibra no presentó una variación significativa, de 19,9 (g/d) a 24,8 (g/d), aumentando del 80% al 99% de las IDR (*Figura 35*). Los estudios señalan ingestas de fibra muy inferiores a las recomendadas (Mohammad-Shirazi y col., 2007; Saka y col. 2012). El intestino de estos enfermos puede causar estreñimiento o bien diarrea. Una dieta rica en fibra con ciruelas pasas añadidas y líquidos adecuados puede aliviar los problemas (Mahan y col., 2012). La alta ingesta de

bebidas azucaradas y baja en fibra, incrementa la producción de insulina y consecuentemente, la producción de ácido araquidónico y sus derivados proinflamatorios (Riccio y Rossano, 2015).

La ingesta diaria de vitaminas mediante el porcentaje de ajuste a las IDR se representa en la *Figura 36*. Se observaron diferencias significativas en tres de ellas, vitamina B1, vitamina B2 y niacina. En los tres casos hubo un aumento de los valores, la vitamina B1, de 1,3 (mg) a 1,5 (mg), suponiendo una ingesta superior a la IDR ( $p=0,034$ ); la vitamina B2 de 12,1 (mg) a 12,2 (mg), con porcentajes de ajuste  $> 100\%$  antes y después de la intervención ( $p=0,002$ ); al igual que en la niacina de 25,3 (mg) a 28,8 (mg) ( $p=0,007$ ). En el resto de vitaminas no se obtuvieron diferencias significativas, aunque los porcentajes de ajuste a las IDR aumentaron en todos los casos tras la intervención, excepto en vitamina E y biotina. De todas las vitaminas sólo el retinol y la vitamina E no sobrepasaron el 100% de las IDR (*Figura 36*). Algunos estudios señalan una disminución de vitamina E en pacientes de EM (Besler y col., 2002; Salemi y col., 2010) y hay que considerar que el aumento de vitamina E está asociado a una menor probabilidad de actividad de la EM sobre todo en pacientes tratados con INF-beta (Løken-Amsrud y col., 2013).

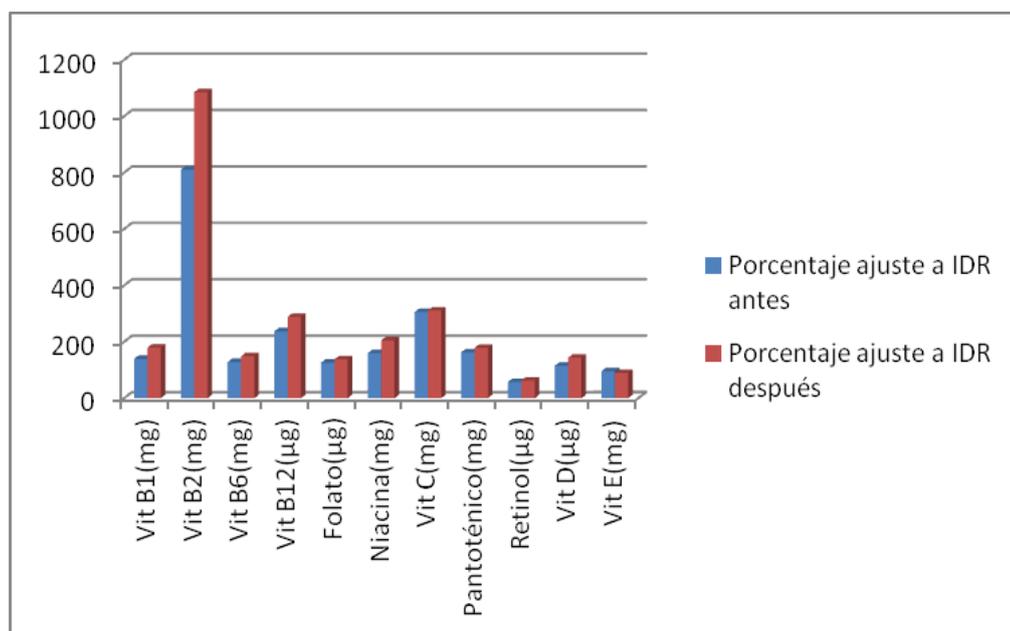


Figura 36. Porcentaje de ajuste a las IDR<sub>s</sub> de vitaminas en la población estudiada antes y después de la ingesta de azafrán, en base al CFC

Aunque algunos autores afirman que no hay correlación entre el déficit de la vitamina B12 y la EM (McDowell y col., 2010), otros autores si establecen una correlación con la enfermedad por su papel en la formación de la mielina y su efecto inmunomodulador (Kocer y col., 2009), encontrándose niveles bajos de vitamina B12 en sangre en enfermos de EMRR (Moghaddasi y col., 20013; Saka y col., 2012). Los pacientes de este estudio mostraron niveles muy por encima de las recomendaciones de ingesta diaria tanto antes como después. Por el contrario aunque aumentó la ingesta de la vitamina A, los porcentajes apenas superan el 50% de las recomendaciones dietéticas (57,7 % y 62,7%). Hay que tener en cuenta que la vitamina A mejora la capacidad cognitiva y la discapacidad en las extremidades superiores del tronco (Bitafaran y col., 2015) e induce condiciones antiinflamatorias, frenando progresión y recaídas (Saboor-Yaraghi y col., 2015).

Hay suficiente evidencia para afirmar que el déficit de vitamina D es un factor de riesgo en la EM y un posible biomarcador del mismo (McDowell y col., 2010; Mirzaei y col., 2011 y Munger y col., 2011). La vitamina D debe valorarse midiendo 25-dihidroxitamina D, y se aconseja aportar como suplemento en ciertas ocasiones (Mahan y col., 2012). Una menor disponibilidad de vitamina D y/o exposición al sol están relacionados con una mayor actividad clínica de la EM (Smolders y col., 2010). Los enfermos de este estudio superan el 100% de las recomendaciones para esta vitamina.

Aunque se precisa seguir investigando en el papel de las vitaminas en la EM, existen numerosas evidencias del papel en la patogénesis de las vitaminas D y B12. Por otro lado las vitaminas A, E y B1 pueden ser beneficiosas para desacelerar la progresión de la EM y mejorar la fatiga y deterioro cognitivo de esta enfermedad (Khosravi-Largani y col., 2018).

La ingesta diaria de minerales se representa en la Figura 37, no observándose diferencias significativas, aunque los porcentajes de ajuste a las IDR aumentaron en todos los parámetros tras la intervención excepto en el iodo. De todos ellos habría que destacar los valores elevados de ingesta de manganeso,

antes y después. Sin embargo, no alcanzaron el 100% de las IDR el sodio, zinc, cloro y yodo.

Bajas ingestas de magnesio, calcio y hierro pueden estar relacionadas con la progresión y actividad de la enfermedad en pacientes con EM progresiva (Ramsaransing y col., 2009; Farez y col., 2016); en nuestro estudio los niveles de estos tres elementos se ajustan a las recomendaciones tanto antes como después.

Sin embargo, la alta ingesta de sodio puede estar relacionada con la progresión y actividad de la EM progresiva (Farez y col., 2016; Ramsaransing y col., 2009). Así nuestros pacientes tienen niveles de ingesta por debajo de los valores de referencia antes y después de la intervención (Figura 37).

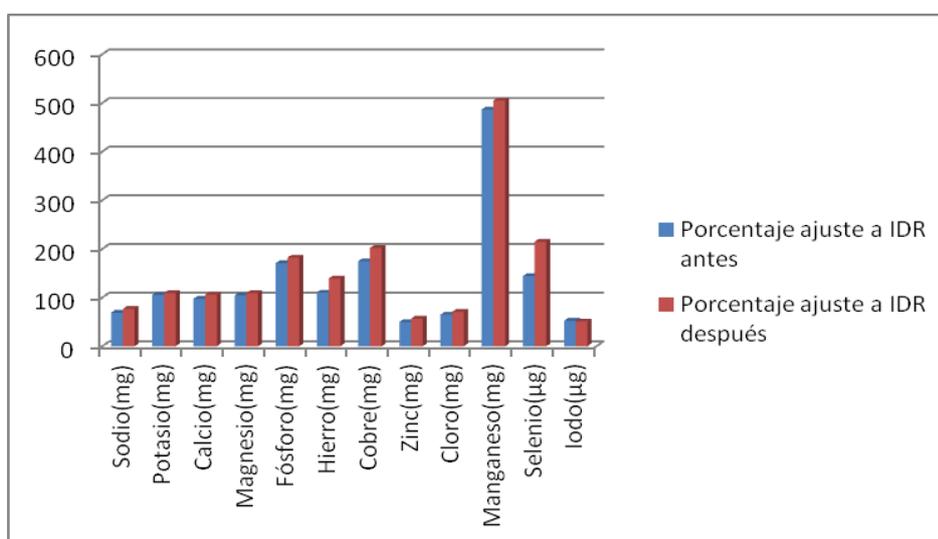


Figura 37. Porcentaje de ajuste a las IDR, de minerales en la población estudiada antes y después de la ingesta de azafrán, en base al CFC

### **Cuestionario de Recuerdo 24 horas**

Paralelamente a los datos de ingesta recogidos mediante el cuestionario CFC, también se recogieron y analizaron los datos de ingesta mediante el cuestionario dietético Recuerdo 24 horas. Los valores medios de la ingesta de energía, macronutrientes, perfil lipídico, fibra, minerales y vitaminas de los pacientes, antes y después de la intervención, se reflejan en la Tabla 24. Los porcentajes de ajuste a las IDR de macronutrientes y micronutrientes se muestran en las Figuras 38, 39 y 40.

Tabla 24. Valores medios de ingesta diaria de energía, macronutrientes, minerales y vitaminas, en los pacientes, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al cuestionario de Recuerdo 24 horas

	Antes	Después	p valor*
<b>Porcentaje pacientes</b>			
<i>Energía (Kcal/d)</i>	58,11	64,30	
<i>Proteínas (g/d)</i>	153,08	137,87	
<i>Grasa (g/d)</i>	112,37	109,08	
<i>AGS<sup>1</sup> (g/d)</i>	121,33	120,59	
<i>AGM<sup>2</sup> (g/d)</i>	78,11	86,98	
<i>AGP<sup>3</sup> (g/d)</i>	124,29	109,16	
<i>Colesterol(mg/d)</i>	72,28	65,63	
<i>HC<sup>4</sup> (g/d)</i>	75,36	84,97	
<i>Fibra (g/d)</i>	69,43	67,93	
<i>Sodio (mg)</i>	85,75	74,67	
<i>Potasio(mg)</i>	85,03	87,69	
<i>Calcio (mg)</i>	80,52	83,81	
<i>Magnesio (mg)</i>	82,09	83,69	
<i>Fósforo (mg)</i>	151,03	146,75	
<i>Hierro (mg)</i>	194,08	125,30	0,003*
<i>Cobre (mg)</i>	119,94	113,58	
<i>Zinc (mg)</i>	64,36	48,62	
<i>Cloro (mg)</i>	70,08	73,37	
<i>Manganeso (mg)</i>	826,46	588,40	
<i>Selenio (µg)</i>	95,77	81,80	
<i>Iodo (µg)</i>	40,03	53	
<i>Vitamina B<sub>1</sub> (mg)</i>	171,99	178,22	
<i>Vitamina B<sub>2</sub> (mg)</i>	87,06	150,4	0,001*
<i>Vitamina B<sub>6</sub> (mg)</i>	95,90	96,82	
<i>Vitamina B<sub>12</sub> (µg)</i>	343,45	284,82	
<i>Folato (µg)</i>	117,57	138,37	
<i>Niacina (mg)</i>	134,92	133,16	
<i>Vitamina C (mg)</i>	212,06	267,91	
<i>Pantoténico(mg)</i>	128,82	136,35	
<i>Biotina (mg)</i>	6002,73	9707,73	0,004*
<i>Retinol (µg)</i>	64,73	88,29	
<i>Vitamina D (µg)</i>	92,81	55,92	
<i>Vitamina E (mg)</i>	81,23	77,59	

<sup>a</sup> Valores presentados como media (desviación estándar) <sup>1</sup> Ácidos grasos saturados; <sup>2</sup> Ácidos grasos monoinsaturados; <sup>3</sup> Ácidos grasos poliinsaturados; <sup>4</sup> Hidratos de carbono. Diferencias significativas para p<0,05. Prueba de Wilcoxon

Los valores de ingesta de energía no mostraron cambios significativos tras las 13 semanas de intervención y, al igual que en el cuestionario CFC, no alcanzaron el 100% de las IDR (Figura 38). Tampoco se observaron significativas respecto a la ingesta de macronutrientes, y fibra, aunque disminuyeron tras la intervención. Sólo los carbohidratos presentaron un ligero aumento (Tabla 24).

La ingesta de proteínas, grasas, AGS y AGP superaron el 100% de los ajustes a la IDR antes y después de la intervención. No alcanzaron las recomendaciones dietéticas los AGM, colesterol, carbohidratos y fibra (*Figura 38*).

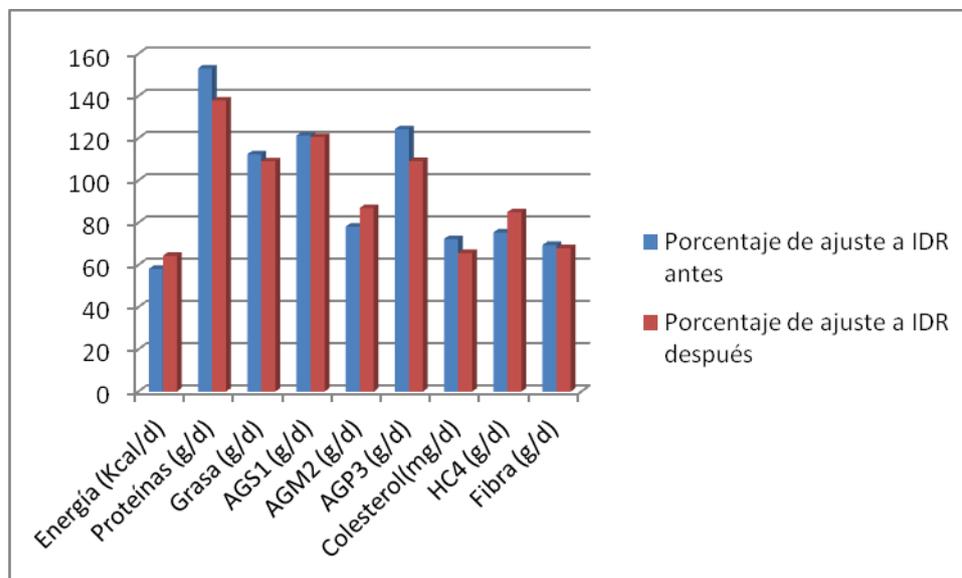


Figura 38. Porcentaje de ajuste a las IDR, de energía, macronutrientes, perfil lipídico y fibra en la población estudiada, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al cuestionario Recuerdo 24 horas

Respecto a los porcentajes de ajuste de los micronutrientes a las IDR cabe destacar la diferencia encontrada para el hierro, con una disminución significativa ( $p=0,003$ ) (*Figura 39*), si bien tanto antes como después estaba por encima del 100% de las IDR, con un valor medio de 22,2 (mg) y 15,7 (mg) respectivamente (Tabla 24). No alcanzaron el 100% de las IDR en la ingesta de los minerales de sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, cloro, selenio y yodo (*Figura 39*).

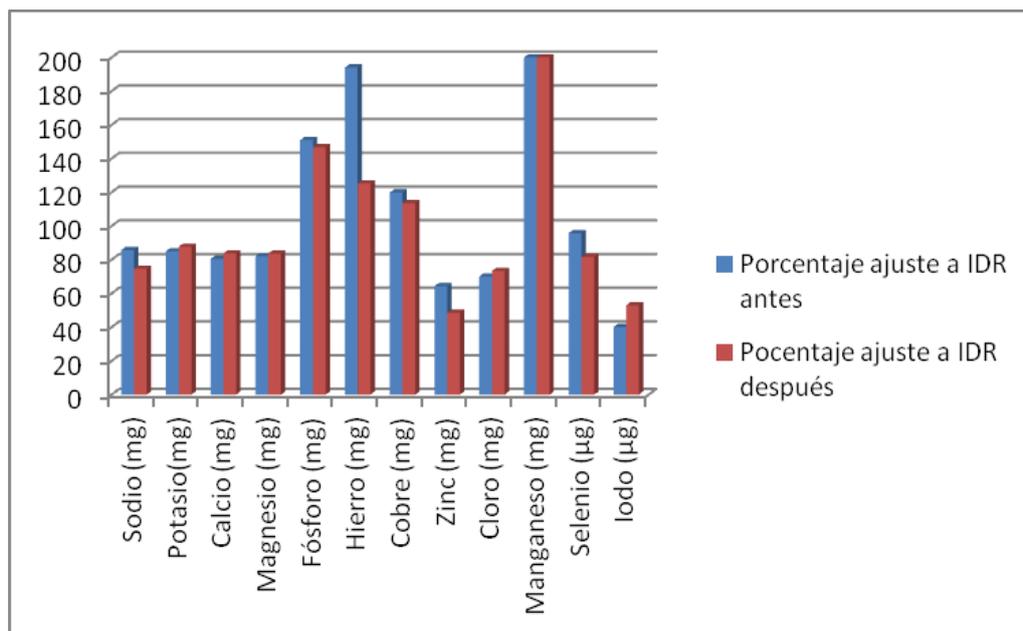


Figura 39. Porcentaje de ajuste a las IDRs de minerales, en los pacientes, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al cuestionario de Recuerdo 24 horas

También se observan variaciones estadísticamente significativas en la vitamina B2 que aumenta llegando a superar el 100% de las recomendaciones y la biotina, que al igual que reflejaba el cuestionario CFC tiene porcentajes de ajuste muy altos (> 100%). Para el retinol, vitamina D y vitamina E, no se alcanzaron el 100% de las IDR (Figura 40).

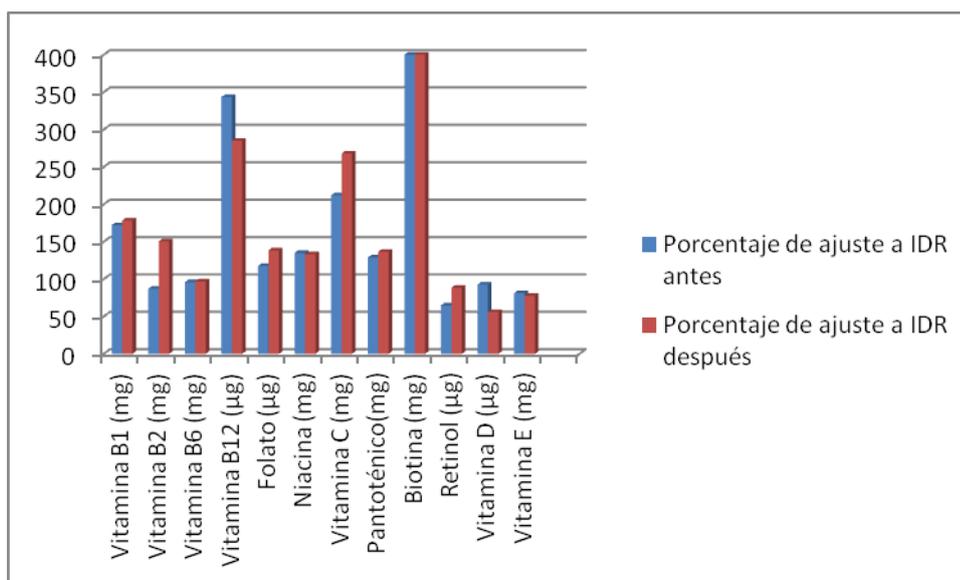


Figura 40. Porcentaje de ajuste a las IDRs, de vitaminas, en los pacientes, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al cuestionario de Recuerdo 24 horas

Las diferencias observadas respecto al cuestionario CFC se podrían explicar debido a las características propias de cada cuestionario ya que el cuestionario de Recuerdo de 24 horas se le entregó al paciente y lo cumplimentó en su casa, recogiendo datos de ingesta de carácter estacional, mientras que el CFC fue realizado por un entrevistador adiestrado, recopilando datos de ingesta a lo largo del año.

### **Cuestionario Conozca su Salud Nutricional (CSSN)**

Los resultados de los distintos ítems del cuestionario CSSN y la valoración del riesgo nutricional de los pacientes, antes y después de la intervención se muestran en la *Tabla 25* y *26*.

Tabla 25. Porcentaje de pacientes con respuesta afirmativa al cuestionario CSSN, antes y después, de la intervención

	Antes	Después	
	Porcentaje pacientes		p-valor
<i>He tenido una enfermedad o afección que ha hecho cambiar el tipo y/o cantidad de alimento que consumo (2)</i>	17	29	0,027*
<i>Tomo menos de 2 comidas al día (3)</i>	0	4	
<i>Como poca fruta, vegetales o productos lácteos (2)</i>	13	13	
<i>Tomo más de 3 vasos de cerveza, licor o vino, casi a diario(2)</i>	0	0	
<i>Tengo problemas dentales que me dificultan comer(2)</i>	13	4	
<i>No siempre tengo suficiente dinero para comprar la comida que necesito(4)</i>	12	0	
<i>Como solo la mayoría del tiempo(1)</i>	4	13	0,007*
<i>Tomo a diario 3 ó más fármacos prescritos o no(1)</i>	54	54	
<i>Sin quererlo he perdido o ganado 5 kg en los últimos 6 meses(2)</i>	21	13	
<i>No siempre puedo comprar, cocinar y/o comer por mi mismo por problemas físicos(2)</i>	87	54	

\*puntuación. p valor: Significación asintótica (bilateral). Prueba Wilcoxon para  $p < 0,05$

Los resultados obtenidos tras formular los 10 ítems con respuesta dicotómica, del cuestionario CSSN, se expresaron como porcentaje de pacientes con respuestas afirmativas. Cada ítem se ponderaba como 1, 2 o 3. En las cuestiones, “Como sólo la mayoría del tiempo “y” Tomo a diario tres ó más fármacos prescritos o no” la puntuación fue 1; las preguntas, “Ha tenido una enfermedad o afección que me ha hecho cambiar el tipo y/o la cantidad de alimento que consumo”, “Como poca fruta, vegetales o productos lácteos”, “Tomo más de 3 vasos de cerveza, licor o vino, casi a diario”, “Tengo problemas dentales que me dificultan comer”, “Sin querer he perdido o ganado 5 kg de peso en los últimos 6 meses” y “No siempre puedo cocinar, preparar y/o comer alimentos por problemas físicos”, puntuaban 2; la respuesta afirmativa a “Tomo menos de 2 comidas al día” se valoraba con 3; y se puntuaba 4, “No siempre tengo suficiente dinero para comprar la comida que necesito”.

El riesgo nutricional se clasifica, en función de la puntuación total obtenida en el test CSSN: riesgo nutricional muy bajo (0-2); riesgo nutricional moderado (3-5) y riesgo nutricional alto si alcanza un valor 6 ó superior. En la Tabla 26 se recoge la puntuación total obtenida mediante el cuestionario CSSN expresada como riesgo nutricional así como la distribución porcentual de pacientes.

Tabla 26. Valoración del riesgo nutricional obtenida mediante el cuestionario CSSN, antes y después de la intervención

	<b>Antes</b>	<b>Después</b>
<b>RIESGO NUTRICIONAL</b>	<b>Porcentaje pacientes</b>	
<i>Riesgo muy bajo (0-2)<sup>a</sup></i>	62%	29%
<i>Riesgo moderado (3-5)</i>	25%	67%
<i>Riesgo alto (6-21)</i>	13%	4%
<b>Valor medio (0-21)<sup>b</sup></b>	2,5 (2,3)	3,1 (2,2)

<sup>a</sup> Escala de puntuación

<sup>b</sup> Valores presentados como la media (desviación estándar)

Los datos de la puntuación total de los pacientes registrados reflejan que un 62% presentaban un riesgo nutricional muy bajo (0-2), frente a un 25% con riesgo moderado (3-5), y un 13% con riesgo alto ( $\geq 6$ ). Tras la intervención con la ingesta de la infusión de azafrán, los valores fueron 29% de riesgo muy bajo, 67% de riesgo moderado y 4% de riesgo muy bajo (*Tabla 26*).

Los resultados del cuestionario CSSN no muestran diferencias significativas en los valores medios de puntuación de riesgo nutricional: 2,5 con un desviación estándar de 2,3; y 3,1 con un una desviación estándar de 2,2, antes y después de la intervención, respectivamente, lo que supone un aumento del riesgo nutricional, no significativo, de muy bajo a moderado (*Tabla 26*).

Algunos autores asocian riesgo nutricional y EM (Kamalian y col., 1975; Fantelli y col., 1978; Cook y col., 1978; Williams y col., 1988; Wozniak-Wowk y col., 1993; Thomas y Wiles, 1999; Pasquinelli y Solaro, 2008), de hecho la discapacidad severa supone un alto riesgo de un pobre estado nutricional (Williams y col., 1988), pero no hay evidencias suficientes para concluir la prevalencia de la desnutrición en pacientes con EM.

La EM viene acompañada de comorbilidades, como las dificultades cognitivas (Clark, 1998; Allen y Lueck, 1999), disfagia (Pasquinelli y Solaro, 2008), entre otros factores, que unido a la dificultad para obtener los alimentos, su preparación, ingesta, y el proceso fisiológico de la digestión y absorción de nutrientes, incrementan el riesgo nutricional de estos pacientes (Posner y col., 1993; Fishman, 1994).

La mayoría de la contribución al riesgo nutricional en los enfermos antes de la intervención, fue atribuida a los siguientes ítems: “No siempre puedo cocinar, preparar y/o comer alimentos por problemas físicos” donde un 87% de los pacientes contestó afirmativamente, en segundo lugar “Tomo a diario tres ó más fármacos prescritos o no”, con 54%, seguido de “Sin quererlo he perdido 5 Kg de peso en los últimos 6 meses” con el 21 %, un

17% contesto afirmativamente a “Enfermedad o afección que me ha hecho cambiar el tipo y/o la cantidad de alimento que consumo”, un 13% de los pacientes contestaron sí, a “Como poca fruta, vegetales o productos lácteos” y “He tenido una enfermedad o afección que ha hecho cambiar el tipo y/o cantidad de alimento que consumo” (*Tabla 25*).

Los porcentajes tras la intervención que ponderaron más en el riesgo nutricional fueron, como antes el ítem “No siempre puedo cocinar, preparar y/o comer alimentos por problemas físicos”, pero con un porcentaje menor que el anterior aunque no significativo, 54% y “Tomo a diario tres ó más fármacos prescritos o no”, con el mismo porcentaje anterior (*Tabla 25*).

Hay dos ítems donde se observaron diferencias significativas que podrían responder al cambio en la puntuación del riesgo nutricional, en “Enfermedad o afección que me ha hecho cambiar el tipo y/o la cantidad de alimento que consumo”, antes 17% y después 29% ( $p= 0,027$ ) y en “Como sólo la mayoría del tiempo”, que paso de 4 % a 13% ( $p= 0,007$ ) (*Tabla 25*).

Las enfermedades neurológicas se asocian con trastornos de deglución y desnutrición. Los pacientes de EM, a lo largo de la historia de su enfermedad, debido a la reducción de la movilidad y la fatiga, dietas inadecuadas, dificultades para comer o beber, falta de apetito, deterioro cognitivo y disfagia, se consideran población en riesgo nutricional (Burgos y col., 2018). El cuestionario CSSN nos informó de que la mayoría de los pacientes estaban en riesgo moderado.

#### **4.4. INFLUENCIA DE LA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL EN LA CALIDAD DE VIDA**

La EM es una patología de curso progresivo con enorme impacto en el paciente, familia y sociedad, que afecta al estado emocional, relaciones personales, empleo e interacción social (Neuhaus y col., 2018; Shorobura, 2018).

El conocimiento de la calidad de vida (CV) del paciente es tan necesario en la práctica clínica como el estudio del deterioro, discapacidad y minusvalía en la carga total experimentada en la enfermedad (Guijarro-Castro y col., 2010).

El dolor, depresión, ansiedad, fatiga, junto a la discapacidad condicionan la vida cotidiana de estos pacientes (Williams y col., 2014; Fiest y col., 2015; Arewasikporn y col., 2018; Prisnie y col., 2018), siendo para ellos tan importante como el empeoramiento físico y la enfermedad en sí misma (Henriksson y col., 2001; Ysraelit y col., 2018).

Demostrar la efectividad de cualquier tratamiento en EM es difícil porque esta enfermedad genera una serie de comorbilidades y síntomas que producen un complejo patrón de discapacidad que en la mayoría de pacientes es progresiva (Terré-Boliart y Orient-López, 2007). La discapacidad neurológica contribuye modestamente a la CVRS, no así la fatiga, discapacidad cognitiva, ansiedad y depresión (Henriksson y col., 2001).

Diversos estudios describen la efectividad del azafrán y sus metabolitos en diferentes modelos de trastornos psiquiátricos, incluidos la depresión y la ansiedad (Akhondzadeh y col., 2004, 2005; Noorbala y col., 2005; Shahmansouri y col., 2014), obteniéndose mejorías significativas utilizando azafrán como coadyuvante de algunos fármacos antidepresivos como la imipramina o fluoxetina (Talaie y col., 2015).

Valorar la CVRS ayuda a conocer las necesidades no cubiertas de los pacientes de EM, desarrollando intervenciones tanto en el aspecto psicológico como físico que mejoren su bienestar (Rosato y col., 2015).

#### **4.4.1. Evaluación de la influencia del azafrán en la calidad de vida con el EuroQol 5D**

El EuroQol 5D (EQ-5D) es un instrumento genérico de medición de la CVRS, que consta de tres indicadores de calidad donde el paciente evalúa su estado de salud de acuerdo a una escala de salud (ES), escala visual analógica (EVA) y escala temporal (ET).

Los porcentajes de la población estudiada de los distintos ítems del cuestionario EQ-5D respecto a las cinco dimensiones que definen el estado de salud del paciente (movilidad, cuidado personal, actividades cotidianas, dolor/malestar y ansiedad/depresión) se muestran en la *Tabla 27*.

Tabla 27. Descripción de los resultados del EuroQol-5D, expresado en porcentaje de pacientes e indicadores de calidad de vida, antes y después de la intervención

	Antes	Después	p-valor
	Porcentaje pacientes		
<b>Movilidad</b>			
<i>Sin problemas para caminar</i>	21	21	
<i>Algunos problemas para caminar</i>	79	79	
<i>Encamado</i>	0	0	
<b>Cuidado personal</b>			
<i>Sin problemas para cuidado personal</i>	83	58	
<i>Algunos problemas para cuidado personal</i>	17	42	
<i>Incapaz de lavarse o vestirse</i>	0	0	
<b>Actividades cotidianas</b>			
<i>Sin problemas para realizarlas</i>	37	42	
<i>Algunos problemas para realizarlas</i>	58	58	
<i>Incapaz de realizarlas</i>	5	0	
<b>Dolor y/o malestar</b>			
<i>No tengo dolor ni malestar</i>	37	50	0,044
<i>Tengo dolor moderado o malestar</i>	59	42	
<i>Tengo mucho dolor o malestar</i>	4	8	
<b>Ansiedad y/o dolor</b>			
<i>No estoy ansioso ni deprimido</i>	58	54	
<i>Estoy moderadamente ansioso o deprimido</i>	38	42	
<i>Estoy muy ansioso o deprimido</i>	4	4	
<b>INDICADORES</b>			
	Antes media(DE) <sup>a</sup>	Después media(DE)	
<i>Valor medio de la escala de salud (ES)</i>	64,58 (14,44)	63,42 (15,43)	
<i>Valor medio de la escala visual analógica (EVA)</i>	0,65 (0,19)	0,64 (0,18)	
<i>Valor medio de la equivalencia temporal (ET)</i>	0,69 (0,23)	0,68 (0,23)	

<sup>a</sup> Valores presentados como la media (desviación estándar); \*p valor=Significación. asintótica (bilateral). Prueba de Wilcoxon Diferencias significativas para p<0,05

Referente a la valoración de la movilidad no hubo diferencias en los pacientes respecto a la intervención nutricional. Un 21% manifestaron no tener dificultad para caminar y un 79% tener algún problema para caminar. Los resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de Arbinaga y col. (2003) con 76,5% de enfermos que reconocen dificultades para caminar. A medida que avanza la enfermedad, las personas que padecen EM pueden tener problemas de equilibrio y sensitivo-motores que impiden la marcha o limitan las movilizaciones y los desplazamientos dentro y fuera del hogar por lo que van a necesitar ayuda de otras personas y/o de dispositivos de apoyo. La ataxia con la pérdida de coordinación muscular es muy discapacitante en estos pacientes (Ko Ko, 1999; Thompson 2002). La espasticidad puede ser leve y compensar en parte la alteración funcional ocasionada por el déficit motor o bien puede ser grave aumentando la discapacidad en la movilidad siendo responsable de dolor e incremento de pérdida funcional.

La fatiga definida como la falta subjetiva de energía física y/o mental percibida por el paciente o cuidador y que le interfiere en el desarrollo de sus actividades habituales es uno de los síntomas más comunes y discapacitantes en estos enfermos (Benito-León y col., 2003) y algún estudio muestra una importante relación entre fatiga y limitaciones físicas y mentales (Janardhan y Bakshi, 2002; Taraghi y Ilali, 2010).

Al inicio del estudio ningún paciente manifestó incapacidad para lavarse o vestirse. Un alto porcentaje (83%) respondió no tener ningún problema y sólo el 17% manifestó tener algunos problemas para realizar su cuidado personal. Tras las 13 semanas del estudio el porcentaje de pacientes que no tenía problemas disminuyó al 58% y, sin embargo aumentó en el ítem de “algunos problemas” a 42%. Este aumento no significativo en los porcentajes puede responder a que todos los individuos con EM experimentan fatiga en algún momento de su enfermedad, como se pone de manifiesto en un estudio de Taraghi y Ilali, 2010, donde el 78% de los pacientes sufrían fatiga. Otro estudio mostró porcentajes similares (35,3%) en el ítem “algun problema para realizar su cuidado personal” (Arbinaga y col.,

2003). Además el 50% de pacientes con EM experimentan fatiga intensa y otros síntomas neurológicos, cuando se exponen a un incremento de su temperatura corporal, debido a fiebre, temperatura ambiente o realización de ejercicio físico intenso, que les supone una pérdida funcional significativa (Terré-Boliart y Orient-López, 2007). Intervenciones que mejoren la fatiga y la depresión en estos pacientes aumentarán su CV, independientemente del tipo de enfermedad y nivel de discapacidad (Kargarfard y col., 2012).

El 37% de los pacientes manifestó no tener problemas para llevar a cabo las actividades cotidianas (trabajar, estudiar, realizar tareas domésticas, etc.) al inicio de la intervención, aumentando a 42% tras la misma. No hubo cambios tras la intervención en los pacientes que expresaron tener algunos problemas para realizar las actividades cotidianas (58%) y solo el 5% se declaró incapaz de realizar las tareas cotidianas al inicio del estudio.

Hubo diferencias significativas respecto a la dimensión dolor y/o malestar ( $p=0,044$ ). Un 63% manifestó tener dolor al inicio y un 50% tras la intervención. Se observó un aumento en los pacientes que manifestaban no tener dolor ni malestar (37%) a 50%, además, disminuyó el porcentaje de los que tenían dolor moderado o malestar de 59% a 42%. Por el contrario, el porcentaje de pacientes que tenía mucho dolor o malestar se elevó de 4% a 8%. El dolor es un síntoma común en pacientes con EM, hecho que se evidencia en algunos estudios que muestran alto porcentaje de pacientes que refieren tener dolor y malestar (88,3%), muy superior a nuestros resultados (Arbinaga y col., 2003).

El 58% de los pacientes manifestó al inicio del estudio no estar ansioso ni deprimido, y tras la intervención este porcentaje fue el 54%. Moderadamente o muy deprimidos se manifestaron un 42% al inicio y un 46% al final, siendo este porcentaje inferior al obtenido en su estudio por Arbinaga y col. (2003) (53%). Aumentó el porcentaje de los que manifestaban estar moderadamente ansiosos o deprimidos de 38% a 42%, no variando los que se sentían muy ansiosos o deprimidos (4%). Generalmente estos

enfermos presentan alta comorbilidad de ansiedad y depresión, hecho que se manifiesta en estudios recientes donde la depresión se presenta en un 36-54% de la población de EM y un 30% de las personas con EM experimentan síntomas compatibles con el trastorno de ansiedad generalizada alguna vez durante el curso de la enfermedad (Gay y col., 2017).

Referente a los indicadores de calidad de EQ-5D, respecto a la valoración del propio estado de salud mediante una escala subjetiva (ES) se observaron valores medios 64,58 y 63,42 antes y después, respectivamente, de una escala de 0 (peor estado de salud imaginable) a 100 (mejor estado de salud imaginable).

Los pacientes evaluaron su propio estado de salud de acuerdo a la escala visual analógica (EVA) mostrando valores de 0,65 al 0,64, antes y después de la intervención. Otros estudios señalan valores semejantes en la valoración de esta escala de 0,58 en mujeres y 0,66 en hombres (Arbinaga y col., 2003).

El valor del indicador sobre equivalencia temporal (ET) reflejó un valor de 0,69 a 0,68, al comparar el paciente su estado de salud hoy con el de hace 12 meses.

#### **4.4.2. Evaluación de la influencia del azafrán en la calidad de vida con el MSQOL-54**

Los resultados del cuestionario MSQOL-54 de calidad de vida relacionada con la salud (CVRS), específico para la EM (Anexo II), están recogidos en la Figura 41.

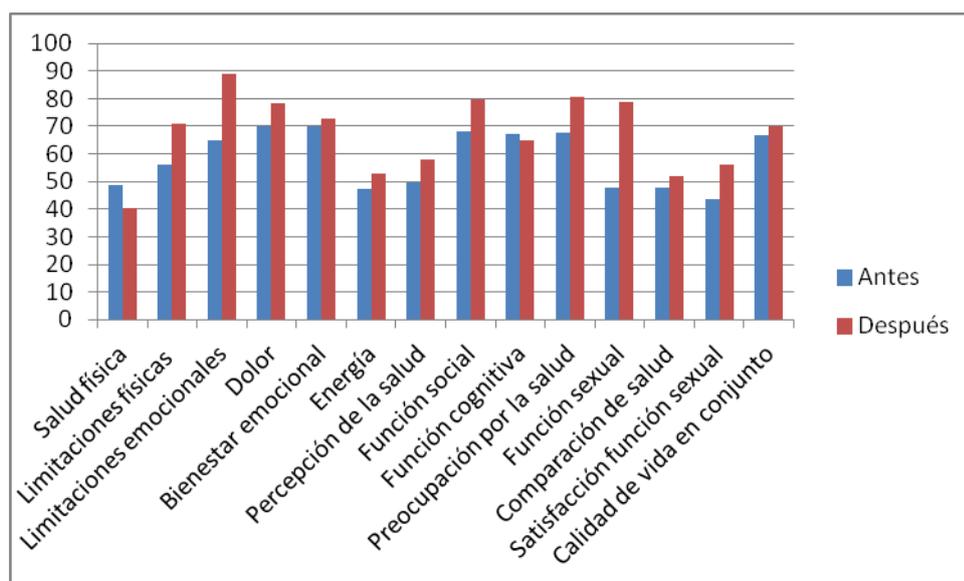


Figura 41. Descripción de los resultados del cuestionario MSQOL-54, antes y después de la ingesta de azafrán

Tras procesar los datos obtenidos de los 54 ítems de los que consta el cuestionario, se observan diferencias significativas en la ponderación de los dos subtotaes correspondientes a la salud física y a la salud mental de los enfermos. La puntuación de los parámetros físicos pasó de una media de 56,25 a 64,82 ( $p=0,003$ ) y la de los parámetros relacionados con la función cognitiva de 67,55 a 76,18 ( $p=0,003$ ) (Tabla 28). Observamos una mejoría significativa en los dos parámetros con un mayor peso en la componente mental que en la física.

Tabla 28. Puntuación física y mental global obtenida con el cuestionario MSQOL-54, antes y después de la intervención

	Antes media (DE) <sup>a</sup>	Después media (DE)	p-valor
<b>PUNTUACIÓN FÍSICA GLOBAL</b>	56,25 (19,16)	64,82 (18,42)	0,003*
<b>PUNTUACIÓN MENTAL GLOBAL</b>	67,55 (21,13)	76,18 (17,92)	0,003*

<sup>a</sup> Valores presentados como la media (desviación estándar); \*p valor=Significación. asintótica (bilateral). Prueba de Wilcoxon Diferencias significativas *entre antes y después* para  $p<0,05$

Estos resultados fueron mejores a los obtenidos en pacientes antes y después de ser tratados con Interferón Beta-1<sup>a</sup> mostrando cambios no significativos (Abolfatli y col., 2012). Hadgkiss y col. (2013) observaron efectos positivos a corto y medio plazo de la CVRS evaluada mediante MSQOL-54 en pacientes de EM que participaron en un programa de modificación del estilo de vida con cambios en la dieta, ejercicio, medicación y meditación.

Valores bajos en las puntuaciones física o mental de la CVRS se asocian con empeoramiento de fatiga y depresión del paciente, de igual forma la progresión de la EDSS se correlaciona con peores puntuaciones físicas, pero no mentales de la CVRS (Bueno y col., 2014).

También se observa que en estadios tempranos de la EM, con EDSS bajas, los pacientes muestran una peor CVRS debido al factor emocional al comienzo de la enfermedad, derivado de la aceptación del diagnóstico (Nortvedt y col., 1999; Pfenning y col., 1999; O'Connor y col., 2001; Janssens y col., 2003); sin embargo con la evolución de la enfermedad el interés del paciente se desplaza a los aspectos físicos de la CVRS (Bueno y col., 2015).

Un estudio longitudinal prospectivo con pacientes de EM, realizado por Hawton y Green (2016) pone de manifiesto el impacto negativo de la EM sobre la CVRS, especialmente la progresión de la enfermedad y la aparición de brotes los 6 meses anteriores. La enfermedad requiere la utilización de terapias durante mucho tiempo, lo que afecta a la CVRS, que decrece inversamente al incremento de la discapacidad de los pacientes (Fanciullacci y col., 2016; Pakdaman y col., 2016). Los pacientes con formas remitentes recurrentes tienen una mejor CVRS que los que padecen formas progresivas y a su vez las formas primarias tienen peor impacto que las secundarias (Lintern y col., 2001).

Además de las puntuaciones física y mental, de las 14 dimensiones que se valoran en el cuestionario MSQOL 54, 6 mostraron diferencias significativas: salud física, limitaciones emocionales, percepción de la salud, función social, preocupación por la salud y función sexual.

Respecto al parámetro salud física, la puntuación media fue de 48,54 y 40,21 antes y después respectivamente ( $p=0,004$ ). Los pacientes mejoraron la percepción respecto a sus limitaciones para realizar actividades en relación a su vida diaria (correr, llevar peso, saltar, caminar).

El ítem “limitaciones físicas que impiden su trabajo o actividad diaria en las 4 últimas semanas”, de una media de 56,25 antes, se obtuvo un valor medio de 70,83, después de la intervención. Hay que considerar que los brotes graves afectan negativamente a la fatiga y la CVRS de los pacientes, así la prevención de las recaídas debe ser un objetivo terapéutico (Mäurer y col., 2016).

Respecto al ítem referido a problemas emocionales como depresión o ansiedad que han influido en el trabajo o actividad cotidiana, mejoraron significativamente mostrando un valor de un 65,28 a un valor 88,89, tras la intervención. Los ítems relacionados con estado emocional (felicidad, sensación de calma, nerviosismo) presentaron una media de 69,83 y tras la administración del azafrán se observó un aumento (72,58), aunque no hubo diferencias significativas. Los síntomas depresivos y la discapacidad cognitiva supone un empeoramiento de la CVRS (Chruzande y col., 2014). El azafrán es utilizado en la medicina tradicional persa para tratar la depresión y demencia (Akhondzadeh y col., 2005) y son muchos los estudios que le atribuyen efectos sobre la función cognitiva (Sugiura y col., 1995a, b; Abe y col., 1998; Abe y Saito, 2000; Pitsikas y col., 2007). Ensayos clínicos con administración de 30 mg/día de extracto seco de azafrán en cápsulas ó 10 mg/día de donepezil (inhibidor de la acetilcolinesterasa sérica) a pacientes con la enfermedad de Alzheimer, mostraron efectividad similar en enfermos de medio a moderado grado de enfermedad de Alzheimer. La frecuencia de efectos adversos fue similar, excepto en el grupo de tratamiento con donepezil donde los vómitos ocurrían con mayor frecuencia (Akhondzadeh y col., 2010 a, b). Otros estudios refuerzan esta acción en la enfermedad de Alzheimer (Faroknia y col., 2014).

Otro estudio en pacientes con trastorno depresivo mayor acompañado de ansiedad, fueron tratados con azafrán (30 mg/día) o antidepresivo citalopram (40mg/día) durante 6 semanas. Los resultados valorados en la escala de Hamilton para la depresión (HAM-D) y escala de Hamilton para la ansiedad (HAM-A) mostraron que no hay diferencias significativas entre el uso del azafrán y el fármaco, proponiendo el azafrán como un tratamiento potencialmente eficaz y tolerable para este trastorno (Ghajar y col., 2016).

La disminución de la actividad de la enfermedad con el tratamiento farmacológico, así como la mejora de la depresión y fatiga son prioritarias para mejorar la CVRS en estos pacientes (Fricska-Nagy y col., 2016).

Respecto al ítem dolor percibido, su interferencia en el trabajo habitual y en disfrutar de la vida, el valor medio aumentó de 70 antes a 78,12 después de la intervención. Un alto nivel de dolor está asociado con mayor fatiga, ansiedad y dificultad para dormir, lo que conlleva mayor estado de depresión en la enfermedad (Amtmann y col., 2015).

La dimensión energía considera el dinamismo y cansancio del paciente. Esta dimensión aumentó de 47,5 a 52,67 tras la intervención. Se observa una disminución de la actividad física de estos pacientes tras su diagnóstico que le puede llevar a enfermedades secundarias o a un empeoramiento de los síntomas. Aumentar la práctica del ejercicio físico puede reducir los efectos negativos de la enfermedad (Frau y col., 2015)

Un cambio significativo se produjo con respecto a la percepción de la salud de 49,58 a 58,13 ( $p=0,009$ ), a la que consideran buena o muy buena y también mejoró significativamente la preocupación por la salud de 67,71 a 80,42 ( $p=0,016$ ).

También mejoraron de 68,05 a 79,51 ( $p=0,041$ ) las relaciones sociales e interfirió menos en ellas los problemas de salud o emocionales.

La función cognitiva que valora la dificultad de concentración, pensar, atención y memoria disminuyó de 67,29 a 64,79. El deterioro cognitivo es

muy prevalente en la EM, entre 45-65% (Baggert y col., 2002), incluso en etapas iniciales de la enfermedad (Olarazán y col., 2009) y muchos pacientes experimentan problemas de memoria aunque los factores de riesgo o de protección son poco conocidos (Leavitt y col., 2017).

La puntuación de la función sexual varió significativamente de 47,91 a 78,83 ( $p=0,001$ ) y la satisfacción con la misma aumentó de 43,75 a 56,25. La desmielinización puede afectar las distintas vías aferentes y eferentes que conectan los centros que controlan la micción dando lugar a la aparición de disfunción urinaria. Las quejas urológicas, en los pacientes con más de 10 años de evolución pueden alcanzar una prevalencia del 96%, siendo, por tanto, una causa importante de incapacitación social y laboral, que merma la calidad de vida y aumenta la morbilidad (Pacheco y col., 2011). La fatiga, el dolor, las alteraciones del ánimo, la espasticidad, la disfunción vesical, las alteraciones del ritmo intestinal o los efectos secundarios de medicamentos pueden interferir en la función sexual normal. La EM afecta a mujeres jóvenes originando disfunción sexual que afecta a su CV (Miletta y col., 2017).

Los cambios percibidos en la salud con respecto a hace un año supusieron una media de 47,92 y 52,08 antes y después de la intervención respectivamente.

La valoración de calidad de vida en conjunto sentida por los pacientes aumentó de 66,98 a 69,93.

La rehabilitación del paciente de EM consigue mejorar su CVRS. Una terapia ambulatoria sobre la capacidad de caminar en enfermos de EM, redujo las dimensiones relacionadas con su función física, percepción de su salud física, dolor, función sexual y satisfacción de la función sexual; mientras que las puntuaciones en bienestar emocional se mantuvieron y las funciones sociales mejoraron (Rintala y col., 2016). Además, la rehabilitación cognitiva genera estrategias para enfrentar los problemas de atención y memoria en estos pacientes, reduciendo su impacto en las actividades cotidianas (Smale y col., 2015).

Por todo ello se puede deducir que el análisis de la CVRS es necesario para valorar y conocer las necesidades no cubiertas de los pacientes de EM, predecir su pronóstico y desarrollar intervenciones en los aspectos tanto físicos como psicológicos (Guijarro-Castro y col., 2010; Rosato y col., 2015, Lincoln y col., 2015; Rintala y col., 2016).

Diversos estudios describen la efectividad del azafrán y sus metabolitos en diferentes modelos de trastornos psiquiátricos, incluidos la depresión y la ansiedad (Akhondzadeh y col., 2004, 2005; Noorbala y col., 2005; Shahmansouri y col., 2014). Se han obtenido mejorías significativas respecto al grupo placebo utilizando azafrán como coadyuvante de algunos fármacos antidepresivos como la imipramina o la fluoxetina (Talaie y col., 2015). Estudios basados en el mecanismo de acción de las sustancias bioactivas del azafrán en la depresión señalan que la crocina puede actuar a través de la inhibición de la absorción de los neurotransmisores dopamina y noradrenalina, y el safranal inhibiendo la recaptación de serotonina. Hay estudios *in vivo* que sugieren efectos inhibitorios sobre las monoaminoxidasas (MAO-A y MAO-B), enzimas de degradación de los neurotransmisores anteriormente citados, provocando un aumento de los niveles de los mismos en el espacio sináptico y disminuyendo los síntomas depresivos de los pacientes (De Monte y col., 2014).

#### **4.4.3. Evaluación de la influencia del azafrán en la capacidad funcional para desarrollo de las actividades cotidianas**

Para evaluar la capacidad funcional de los pacientes en el desarrollo de las actividades de la vida diaria (AVD) se empleó el índice de Katz (Katz y col., 1963) y el índice de Barthel (Mahoney y Barthel, 1965).

##### ***Índice de Katz***

Uno de los test utilizados para valorar el nivel de independencia en el autocuidado en estos pacientes fue el Índice de Katz (IK) que evaluó la

capacidad o incapacidad para efectuar una serie de tareas: bañarse, vestirse, usar el lavabo, traslados, continencia y alimentación. El resultado final se expresa, en función de la mayor o menor independencia para realizar dichas funciones, mediante letras mayúsculas clasificando en 8 niveles o grados de dependencia a los pacientes: A= independiente, B= independiente todas menos una actividad, C= dependiente en baño y otra, D= dependiente baño y otras dos, E= dependiente baño y otras tres, G= dependencia total, H= dependientes en al menos 2 funciones pero no clasificados como C, D, E o F (Katz y col., 1963).

Antes de la intervención el grupo mayoritario se encuadró bajo la categoría de dependencia A (independiente en todas las funciones) con un porcentaje de 45,8%; seguido de categoría B (independiente en todas las funciones menos una) mostrando un 37,5%. Fueron dependientes en el baño y otra función el 4,2% (categoría C); y el mismo porcentaje la categoría D (dependientes en el baño, vestido, y otra función), y la categoría F (dependientes en el baño, vestido, lavabo, traslados y otra función) (*Figura 42*).

Tras la intervención, la categoría de dependencia A y B, solo mostraron un 37,5%. El 8,3% fueron dependientes en categoría C. Por último, el 4,2% fueron dependientes en categoría D, y 12,5% fueron dependientes en categoría H (*Figura 42*).

La mayoría de los pacientes, antes y después de la intervención, presentaron ausencia de incapacidad o incapacidad leve (categorías A-B) (83,3% y 75%). Mostraron incapacidad moderada (categorías C-D) 8,4% antes y 12,5% después; y fueron dependientes en más de 4 funciones (categorías E-G) 4,2 % antes y 0% después (*Figura 42*).

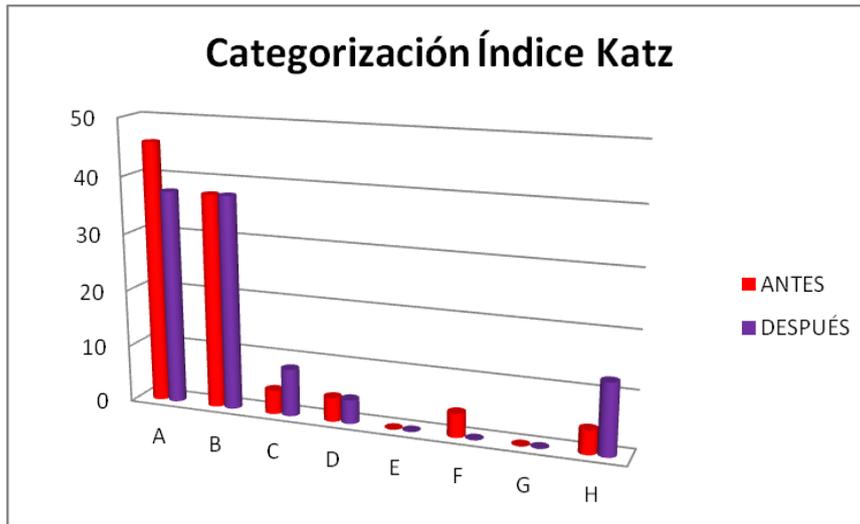


Figura 42. Distribución porcentual en función de las categorías de dependencia (A.H) del índice de Katz, antes y después de la intervención

La Figura 43 muestra la distribución porcentual del nivel de independencia en el autocuidado en esta población respecto a las 6 tareas evaluadas en el IK.

La función más afectada en estos pacientes fue la continencia. El 42% de los pacientes tenía accidentes ocasionales, el 8% era incontinente y sólo el 50% controlaba por sí mismo la micción y la deposición antes de la intervención. Tras la misma se observa que no varía el porcentaje de incontinencia ocasional (42%) y hay una ligera tendencia no significativa respecto a continencia (4%) y control de la micción (54%) (Figura 43).

Los pacientes con EM a menudo presentan disfunción urinaria e intestinal, debido a la pérdida de control sensorial y motriz con impacto negativo en su CV (Martínez y col., 2016). La incontinencia urinaria está presente en un 49% de los pacientes en algún momento de la evolución de la enfermedad (Fernández y col., 2005). Algunos autores señalan este porcentaje en el 75% (Bonniaud y col., 2004). El 53% de los pacientes de EM tienen hiperactividad del esfínter detrusor, por contracciones involuntarias derivadas de la enfermedad, 43% disinergia del esfínter detrusor y 12 % vejiga atónica (Stoffel, 2017).

Los pacientes fueron independientes para el baño, entrando y saliendo de la bañera por sí mismos, 87% antes y 79% después; necesitaban ayuda 8% y 21%, antes y después, respectivamente y 4% eran dependientes y dejaron de serlo. Respecto a la actividad de coger la ropa y vestirse completamente sin asistencia, se observó en un 87% antes y 75% después; necesitaban mínima ayuda 4% y 25%, antes y después y 9% eran dependientes y dejaron de serlo tras la intervención. El ítem de traslados se analizó mediante las cuestiones entrar y salir de la cama, sentarse y levantarse de la silla, mostrando 100% de independencia el 96% antes y 88% después; necesitaban alguna asistencia 4% y 12%, antes y después, respectivamente. Referente al ítem lavabo, iban al lavabo por sí mismos sin necesidad de ayuda 96% antes y 100% después; dejando de necesitar ayuda 4%. Los pacientes fueron independientes en la función alimentación 96% y 92%, antes y después de la intervención; sólo 4% antes y 8% después necesitó asistencia para alguna maniobra concreta como cortar la carne (*Figura 43*).

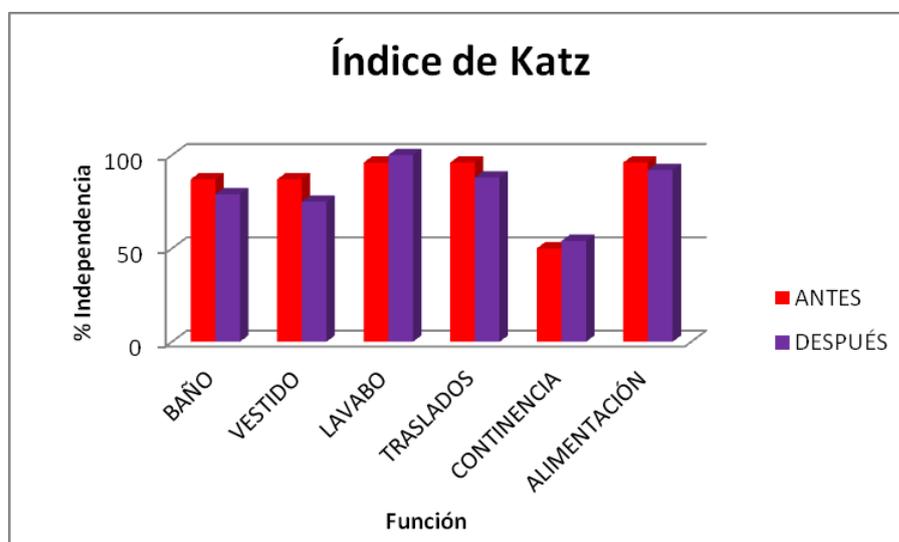


Figura 43. Distribución porcentual de independencia para las seis tareas evaluadas mediante el índice de Katz, antes y después de la intervención

No se observan cambios significativos después de la intervención, resultado coincidente con el estudio llevado a cabo por Ytterberg y col.

(2008) en pacientes de EM durante 2 años sin cambios significativos en el IK de la muestra.

### ***Índice de Barthel***

El nivel de dependencia mediante el índice Barthel (IB), expresado como media de la puntuación total, aumentó ligeramente de 85,75 a 87,08 tras la intervención. El valor del IB varía entre el mínimo de 0 (completamente dependiente) y el máximo de 100 (completamente independiente) (Mahoney y Barthel, 1965; Wylie, 1987), por lo tanto nuestros valores están, antes y después de la intervención, dentro del rango considerado de dependencia moderada (61-90) con un alto grado de autonomía. Se observó una tendencia a la mejoría en la puntuación tras la intervención, aunque estadísticamente no significativa. El IB muestra puntuaciones semejantes en otros estudios como Einarsson y col., 2006 (81-100) y Monji y col., 2009 (77, 5).

Se analizó el nivel de dependencia mediante IB (dependencia total, dependencia severa, dependencia moderada, dependencia escasa e independencia total). Ningún paciente mostró dependencia total (IB de 0-20) ya que el estudio se realizó en una población con un EDSS<6,5. Los porcentajes, antes y después fueron: grupo con dependencia severa (IB de 21-60) 8,3 y 4,2; grupo con dependencia moderada (IB de 61-90) 45,8 y 66,7; grupo de dependencia escasa (IB de 91-99) 29,2 y 12,5; no observándose cambios en el grupo con IB de 100 con un 16,7% antes y 16,6% después (*Figura 44*).

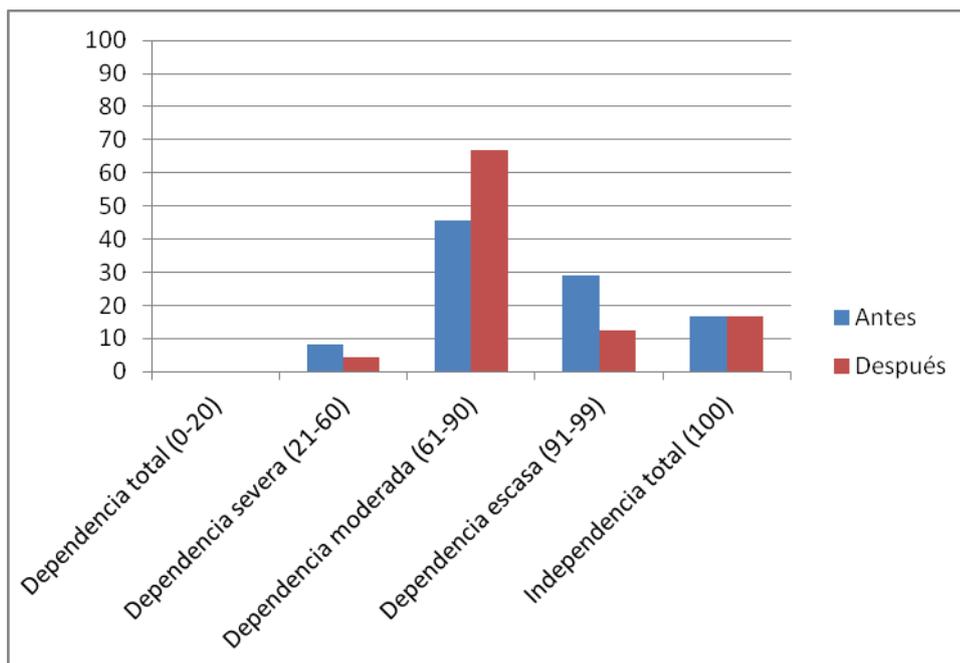


Figura 44 Distribución porcentual de independencia mediante el índice de Barthel, antes y después de la intervención

Distintos estudios de funcionalidad que valoran la independencia para la realización de AVD en personas con EM refieren porcentajes semejantes a los de este estudio (Midgard y col., 1996; McDonell y Hawkins, 2001; Modrego y col., 2001; Rodríguez y col. 2008). Las variaciones observadas pueden atribuirse a variables como el tipo o momento evolutivo de la enfermedad, duración en años y EDSS. La EM presenta un efecto acumulativo de múltiples lesiones a diferentes niveles, que determinarán una multiplicidad de déficit que variarán el grado de discapacidad y minusvalía (Marck y col., 2018).

El porcentaje de personas con independencia en todos los ítems del IB en nuestro estudio fue 16,7 y 16,6, antes y después (Figura 44). Estos resultados son inferiores al que muestra el estudio de Einarsson y col. (2006) en pacientes de EM (52%).

De la población estudiada, el mayor porcentaje de ella se clasifica con nivel de dependencia moderada (IB de 61-90) antes y después de la intervención nutricional (Figura 44).

La *Figura 45* muestra el nivel de independencia mediante el índice Barthel (IB) (valores de los 10 ítems, puntuación total (0-100), expresado en porcentaje de pacientes antes y después de la intervención.

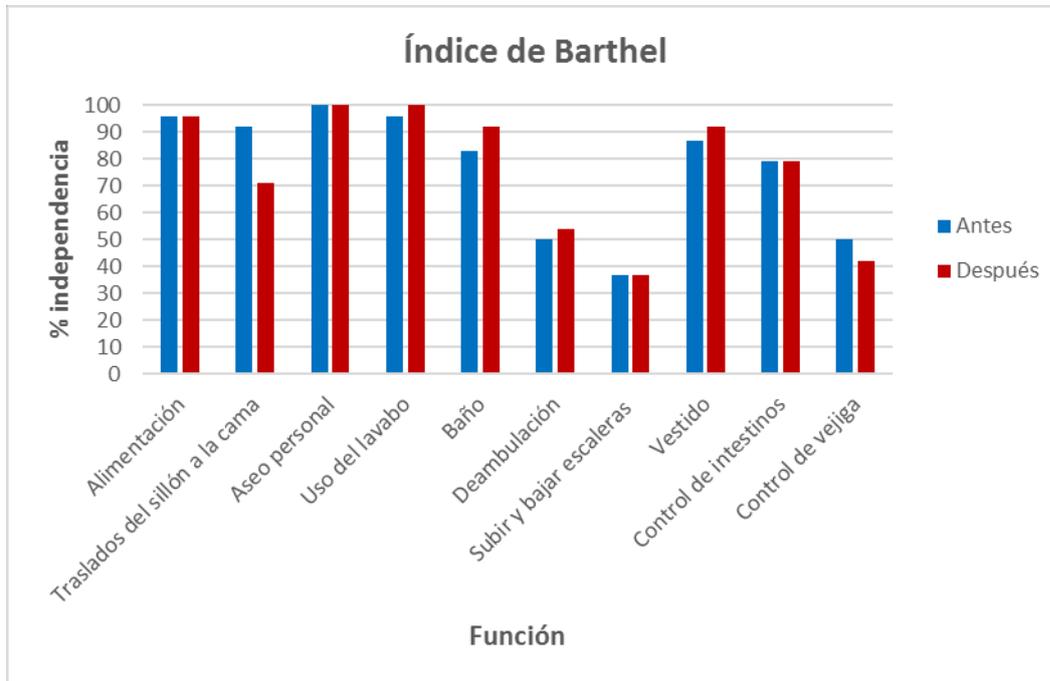


Figura 45. Distribuci3n porcentual de independencia para las diez tareas evaluadas mediante el índice de Barthel, antes y después de la intervenci3n

Respecto a la alimentaci3n, la mayoría de los pacientes estudiados (96%) son capaces de comer por sí mismos en un tiempo razonable, no observándose cambios tras la intervenci3n; sólo un 4% necesita alg3n tipo de ayuda y ninguno es incapaz de alimentarse sólo.

El 92% de los pacientes son independientes para trasladarse del sill3n a la cama antes de la intervenci3n y tras la misma disminuye a 71%. Necesitan una mínima ayuda o alguna supervisi3n el 4% antes y el 29% después. Un 4% necesitaba ayuda para los traslados antes de la intervenci3n y ningún paciente la precisó tras la misma.

Todos los pacientes, antes y después, son capaces de lavarse peinarse y cepillarse los dientes.

Los pacientes que pueden entrar y salir del lavabo solo o con ayuda de alg3n soporte, si lo precisan, aumentaron de 96% a 100%.

Respecto al uso de la bañera o ducha sin asistencia, se observó un aumento de 83% a 92% tras la intervención y de 17% que precisaban ayuda, disminuyó a 8%.

Los pacientes que pueden caminar sin ayuda ni supervisión aumentaron de un 50% a 54%; y los que lo hacen con ayuda disminuyeron de 46% a 42%. Hay que tener en cuenta que uno de los pacientes utilizaba silla de ruedas.

El 37% de los pacientes fueron independientes para subir y bajar un tramo de escaleras, con seguridad y sin ayuda, antes y después de la intervención; el 46% ,que podía hacerlo con ayuda antes de la intervención, aumentó a 50% tras la misma. Los pacientes dependientes para subir y bajar escaleras, fueron 17% antes y 13% después.

La mayoría de los pacientes fueron capaces de coger su ropa y vestirse solos, 87% y 92%, antes y después, respectivamente. El 13% precisaba alguna ayuda para anudarse los cordones de los zapatos antes y el 8% tras la intervención.

No se observaron cambios respecto al ítem “control de intestinos”. La mayoría de los pacientes (79%) pudieron controlar sin accidentes. No hubo variación, tras la intervención, en el porcentaje de pacientes que manifestaron algún episodio de incontinencia o precisaban usar enemas o supositorios (17%) y el 4% fue incontinente, antes y después de la intervención.

El 50% de los pacientes controlaba la vejiga día y noche y tras la intervención el 42%. Los pacientes que tuvieron ocasionalmente algún episodio de incontinencia aumentaron 37% a 54%, disminuyendo de 13% a 4% incontinentes de vejiga, tras la intervención nutricional.

Los ítems en los que la mayoría de los pacientes fueron independientes antes y después fueron: aseo personal (100%), alimentación (96%), uso del lavabo (96% y 100%), vestido (87% y 92%), baño (83% y 92%), control de

intestinos (79%) y traslados del sillón a la cama (92% y 71%). Estos resultados se aproximan a los de Einarsson y col. (2006): aseo personal (91%), alimentación (78%), uso del lavabo (80%), vestido (73%), baño (74%), control de intestinos (85,5%) y traslados del sillón a la cama (80%). Otro estudio mostró 30% de pacientes con total independencia en las funciones baño, vestido y alimentación, pero la duración media de la enfermedad en estos pacientes era de más de 18 años (McDonell y Hawkins, 2001).

Las actividades que generaban mayor dependencia fueron las relacionadas con la movilidad y control de vejiga: deambulación (50% y 46%), subir y bajar escaleras (63%) y control de vejiga (50% y 58%); coincidentes con otros estudios: deambulación (61%), subir y bajar escaleras (62%) y control de vejiga (77%) (Einarsson y col., 2006)

Comparar los resultados con la de otros estudios es complejo por la dificultad de medir discapacidad en estos pacientes debido a la progresión de la enfermedad y el complejo patrón de comorbilidades y síntomas que presenta (Terré-Boliart y Orient-López, 2007). Esta razón complica demostrar la efectividad de cualquier tratamiento en EM.

La aportación del azafrán a estos resultados podría estar relacionada con sus acciones antinociceptivas, antiinflamatorias y antidepresivas. Los extractos acuosos y etanólicos de estigma y pétalos de *C. sativus* muestran actividad antinociceptiva en ensayos de dolor. Los extractos de estigma mostraron actividad contra la inflamación aguda y crónica. Estos efectos pueden ser debidos a su contenido en flavonoides, taninos y antocianinas ya contrastados en otros estudios (Bittar y col., 2000; Saura-Calixto y col., 2007) y demostrados con safranal a dosis entre 0,1 y 0,5 ml/kg (Hosseinzadeh y Sadeghnia, 2007a), pero se desconoce el mecanismo de acción (Hosseinzadeh y Younesi 2002). Las crocinas han demostrado efecto anti-inflamatorio en algunos modelos de inflamación (Ma y col., 1998).

#### 4.4.4. Evaluación de la influencia del azafrán sobre el equilibrio y la marcha: Test de Tinetti

La valoración de la marcha y equilibrio se realizó mediante el test de Tinetti, antes y después de la intervención. Esta escala ha sido utilizada en numerosos estudios con pacientes de EM para evaluar la efectividad de diferentes terapias, pues el deterioro motor está frecuentemente asociado a la enfermedad, (Muñoz-Lasa y col., 2012; Gutierrez y col., 2013; Salhofer-Polanyi y col., 2013; Kubsik y col., 2014; Russo y col., 2018).

La *Figura 46* describe los resultados de este test, expresado como puntuaciones medias en la marcha, equilibrio y puntuación total, al inicio y final del estudio. La puntuación media total obtenida fue de 20,78 antes y 17,56 después, sobre una puntuación máxima de 28. La puntuación media en la marcha fue 7,95 y 7,33, y la de equilibrio 12,73 y 11, antes y después de la intervención.

Una puntuación total de hasta 18 puntos supone un riesgo importante de caídas, valores entre 19-24 un cierto riesgo de caídas y 25-28 un riesgo mínimo de caídas.

Los pacientes presentaban antes de la intervención un cierto riesgo de caídas con una puntuación media de 20,78 que tras la intervención disminuyó a una puntuación total de 17,56.

La puntuación máxima en la marcha es de 12 y nuestros pacientes mostraron unos valores de 7,95 y 7,33, antes y después. La puntuación sobre el equilibrio sufrió una variación significativa disminuyendo de 12,73 a 11 tras la intervención sobre una puntuación máxima de 16.

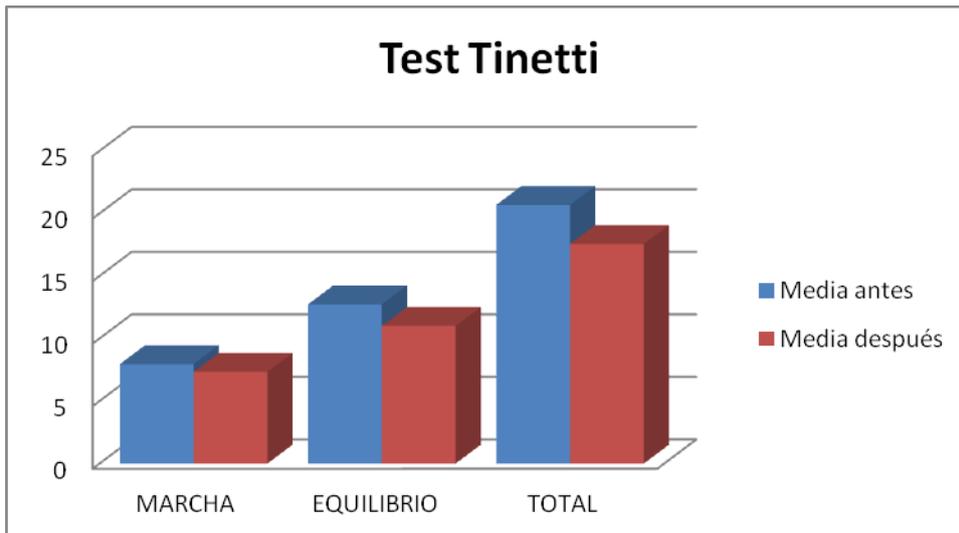


Figura 46. Descripción de los resultados del test de Tinetti, antes y después de la ingesta de azafrán

No hay evidencias de que el azafrán afecte directamente a estos factores, pero sí hay estudios que sugieren mejoría del estado emocional y adaptación del paciente a su enfermedad (Akhondzadeh y col., 2004; Moshiri y col., 2006; Pitsikas y col., 2008; Hosseinzadeh y col., 2007a; Hosseinzadeh y Noraei, 2009); efectos sedativos/relajantes (Hosseinzadeh y Ghenaati y col. 2006; Nemati y col., 2008); y actividad antinoceptiva y antiinflamatoria en inflamación aguda y crónica (Ma y col., 1998; Hosseinzadeh y Younesi 2002).

No podemos hablar de un patrón específico de marcha en el sujeto con EM, sino que ésta se verá alterada de manera diferente de un paciente a otro (Rodgers y col., 1999; Benedetti y col., 1999). Los resultados indican un aumento en el riesgo de caídas en los pacientes no tratados en discapacidad en la marcha.

Son numerosos los estudios sobre intervenciones no farmacológicas basados en programas de tratamiento para conservación de energía, ejercicio, estiramientos, dieta, yoga, tai chai, pilates, relajación, etc. (Dettmers 2009; Garrett 2013; Plow 2014; Coote y col., 2014), pero la mayoría no presentan evidencias sólidas ya que la población estudiada se limita a EM recurrente remitente con EDSS inferior a 7 en la mayoría de los estudios, y por tanto puede ser menos aplicable a otros tipos de EM. Algunos

tratamientos farmacológicos son utilizados para mejorar y tratar la fatiga (Flachenecker y col., 2016).

Se recomienda evaluar los problemas de movilidad y/o fatiga en los pacientes con EM estableciendo metas individuales y para ello se precisarán especialistas en rehabilitación y fisioterapeutas con experiencia en EM que supervisen y dirijan un entrenamiento progresivo moderado de la resistencia y el ejercicio aerobio.





## ***5. CONCLUSIONES***



## 5. CONCLUSIONES

1. Las mejores condiciones para que se produzca la máxima extracción de los metabolitos bioactivos del azafrán (crocinas, picrocrocina y safranal) son: partir de azafrán molido, infundado con agua a punto de ebullición y dejando reposar 10 minutos.
2. Se evitan dosificaciones erróneas del azafrán determinando el contenido de crocinas, picrocrocina y safranal mediante HPLC-DAD y, no así, con la utilización de la metodología descrita en la Norma ISO3632 basada en UV-vis.
3. La composición de metabolitos bioactivos del azafrán suministrado a los voluntarios es estable durante los 93 días del estudio. El envasado en sobres contribuye a preservar las condiciones adecuadas de conservación en ausencia de luz y humedad.
4. Las analíticas del suero sanguíneo de los pacientes presentan parámetros bioquímicos dentro de los valores normales de referencia. Se observa una tendencia a la mejora del perfil lipídico, con disminución del colesterol total, triglicéridos y LDL-colesterol y aumento del HDL colesterol, tras la toma de la infusión de azafrán. Esta diferencia no es significativa y deberá investigarse en estudios posteriores con mayor número de pacientes.
5. Tras la ingesta de azafrán se observa una disminución de la grasa corporal y densidad corporal tricípital, pero no hay cambios en la masa muscular en los pacientes.
6. Tras la intervención aumenta significativamente el consumo de cereales, pescado y legumbres, y disminuye el de productos lácteos. No hay modificación en la ingesta de fruta, vegetales, aceite y huevos, por lo que se deberá recomendar un aumento.

7. La dieta habitual de estos pacientes presenta una alta ingesta proteica, tanto al inicio como tras la intervención. El consumo de lípidos es también alto, sobre todo en ácidos grasos poliinsaturados. El consumo de hidratos de carbono aumenta significativamente, aunque coincidiendo con otros estudios, sigue por debajo de los objetivos nutricionales. La ingesta de fibra continúa siendo inferior a la recomendada.
  
8. En base al cuestionario Recuerdo 24 horas, respecto a los micronutrientes se observa un aumento significativo de la ingesta de vitaminas B2 y biotina y la ingesta de los siguientes minerales sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, cloro, selenio y yodo, está por debajo de los valores recomendados. Según el cuestionario CSSN se observa un incremento del número de pacientes con riesgo nutricional moderado.
  
9. La calidad de vida relacionada con la salud de los pacientes mejora significativamente tras la intervención. Disminuyen las dificultades de concentración, atención y memoria; los problemas emocionales, como depresión o ansiedad; y la percepción respecto a sus limitaciones para realizar actividades en relación a su vida diaria. Mejora la autopercepción de los pacientes respecto a su estado de salud, siendo buena o muy buena. Además, aumentan sus relaciones sociales e interfiere menos en ellas los problemas de salud o emocionales. Respecto a su sexualidad, aumenta significativamente la satisfacción de los pacientes.
  
10. La mayoría de estos pacientes presentan un nivel de dependencia moderada con un alto grado de autonomía para la realización de las actividades de la vida diaria. Las variaciones observadas muestran tendencia a una menor dependencia tras la intervención.
  
11. Estos pacientes presentan un riesgo importante de caídas, probablemente debido al deterioro motor asociado a la enfermedad.



## **6. BIBLIOGRAFÍA**



## 6. BIBLIOGRAFÍA

## A

- Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp. Bio. Med.* 2002; 227:20-25.
- Abdullaev FI, Espinosa-Aguirre JJ. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detect Prev.* 2004; 28(6):426-432.
- Abe K, Sugiura M, Shoyama Y, Saito H. Crocin antagonizes ethanol inhibition of NMDA receptor-mediated responses in rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 1998 Mar 16;787(1):132-8.
- Abe K, Sugiura M, Yamaguchi S, Shoyama Y, Saito H. Saffron extract prevents acetaldehyde-induced inhibition of long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Brain Res.* 1999 Dec 18;851(1-2):287-9.
- Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytother Res.* 2000 May;14(3):149-52.
- Abete I, Goyenechea E, Zulet MA, Martínez JA. Obesity and metabolic syndrome: potential benefit from specific nutritional components. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011 Sep;21 Suppl 2:B1-15.
- Abo-Krysha N, Rashed L. The role of iron dysregulation in the pathogenesis of multiple sclerosis: an Egyptian study. *Mult Scler.* 2008 Jun;14(5):602-8.
- Abolfazli R, Hosseini A, Gholami Kh, Javadi MR, Torkamandi H, Emami S. Quality of Life Assessment in Patients with Multiple Sclerosis Receiving Interferon Beta-1a: A Comparative Longitudinal Study of Avonex and Its Biosimilar CinnoVex. *ISRN Neurol.* 2012;2012:786526.
- Abraham A, Drory VE. Influence of serum uric acid levels on prognosis and survival in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol.* 2014 Jun;261(6):1133-8.
- Agha-Hosseini M, Kashani L, Aleyaseen A, Ghoreishi A, Rahmanpour H, Zarrinara AR, Akhondzadeh S. *Crocus sativus* L. (saffron) in the treatment of premenstrual syndrome: a double-blind, randomised and placebo-controlled trial. *BJOG.* 2008 Mar;115(4):515-9.
- Ahmad AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Hoda MN, Islam F. Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005 Aug;81(4):805-13.
- Akhondzadeh S, Fallah-Pour H, Afkham K, Jamshidi AH, Khalighi-Cigaroudi F. Comparison of *Crocus sativus* L and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial *BMC Complement Altern Med.* 2004;4:12.
- Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Noorbala AA, Amini H, Fallah-Pour H, Jamshidi AH, Khani M. *Crocus sativus* L. in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Phytother Res.* 2005 Feb;19(2):148-51.
- Akhondzadeh S, Sabet MS, Harirchian MH, Togha M, Cheraghmakani H, Razeghi S, Hejazi SSh, Yousefi MH, Alimardani R, Jamshidi A, Zare F, Moradi A. Saffron in

- the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a 16-week, randomized and placebo-controlled trial. *J Clin Pharm Ther.* 2010a Oct;35(5):581-8.
- Akhondzadeh S, Shafiee Sabet M, Harirchian MH, Togha M, Cheraghmakani H, Razineghi S, Hejazi SS, Yousefi MH, Alimardani R, Jamshidi A, Rezazadeh SA, Yousefi A, Zare F, Moradi A, Vossoughi A. A 22-week, multicenter, randomized, double-blind controlled trial of *Crocus sativus* in the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl).* 2010b Jan;207(4):637-43.
- Aksungar FB, Topkaya AE, Yildiz Z, Sahin S, Turk U. Coagulation status and biochemical and inflammatory markers in multiple sclerosis. *J Clin Neurosci.* 2008 Apr;15(4):393-7.
- Alavizadeh, S.H.; Hosseinzadeh, H. Bioactivity assessment and toxicity of crocin: A comprehensive review. *Food Chem. Toxicol.* 2014, 64, 65–80.
- Aldershvile J, Ambrosio G, Bayés de Luna A, Badimon L, Bertrand ME, Cleand J, et al. Estrés oxidativo (especies de oxígeno reactivo), patología cardiovascular (Parte I) *Eur Cardiol J.* 1998;3(72):
- Algahtani HA, Shirah BH, Alzahrani FA, Abobaker HA, Alghanaim NA, Manlangit JS Jr. Quality of life among multiple sclerosis patients in Saudi Arabia. *Neurosciences (Riyadh).* 2017 Oct;22(4):261-266.
- Allen CMC, Lueck CJ. (1999) Diseases of the nervous system: multiple sclerosis. In Davidson's Principles and Practice of Medicine, 18th edn. Eds Haslett, C., Chilvers, E.R., Hunter, J.A.A. & Boon, N.A., pp. 983-986. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Alonso GL, Salinas MR, Estebán-Infantes FJ, Sánchez MA. Determination of safranal from saffron (*Crocus sativus* L.) by thermal desorption-gas chromatography. *J Agric Food Chem.* 1996; 44: 185-188.
- Alonso GL, Salinas MR, Garijo J. Method to determine the authenticity of aroma of saffron (*Crocus sativus* L.). *J Food Prot.* 1998 Nov;61(11):1525-8.
- Alonso GL, Salinas MR, Sánchez-Fernández MA, Garijo J. Note. Physical parameters in controlling saffron quality. *Int. J Food Sci. Technol.* 2000 Feb; 84 (5):59-65
- Alschuler KN, Jensen MP, Ehde DM. The association of depression with pain-related treatment utilization in patients with multiple sclerosis. *Pain Med.* 2012 Dec;13(12):1648-57.
- Alshubaili AF, Awadalla AW, Ohaeri JU, Mabrouk AA. Relationship of depression, disability, and family caregiver attitudes to the quality of life of Kuwaiti persons with multiple sclerosis: a controlled study. *BMC Neurol.* 2007 Sep 18;7:31.
- Amato MP, Ponziani G, Amaducci L. Cognitive impairment in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl.* 1999;50:465-8.
- Amato MP, Ponziani G, Rossi F, Liedl CL, Stefanile C and Rossi L. Quality of life in multiple sclerosis: the impact of depression, fatigue and disability. *Mult Scler.* 2001; 7, 340–344.
- Amin B, Hosseinzadeh H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Fitoterapia.* 2012 Jul;83(5):888-95.

- Amorini AM, Petzold A, Tavazzi B, Eikelenboom J, Keir G, Belli A, Giovannoni G, Di Pietro V, Polman C, D'Urso S, Vagnozzi R, Uitdehaag B, Lazzarino G. Increase of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients. *Clin Biochem.* 2009 Jul;42(10-11):1001-6.
- Amtmann D, Bamer AM, Johnson KL, Ehde DM, Beier ML, Elzea JL, Bombardier CH. A comparison of multiple patient reported outcome measures in identifying major depressive disorder in people with multiple sclerosis. *J Psychosom Res.* 2015 Dec;79(6):550-7.
- Anastasaki EG, Kanakis CD, Pappas C, Maggi L, Zalacain A, Carmona M, Alonso GL, Polissiou MG. Quantification of crocetin esters in saffron (*Crocus sativus* L.) using Raman spectroscopy and chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 6011-6017.
- Arbinaga F. Aspectos emocionales y calidad de vida en pacientes con enfermedades desmielinizantes: El caso de la esclerosis múltiple. *Anales de psicología.* 2003;19(1): 65-74.
- Arewasikporn A, Turner AP, Alschuler KN, Hughes AJ, Ehde DM. Cognitive and affective mechanisms of pain and fatigue in multiple sclerosis. *Health Psychol.* 2018 Jun;37(6):544-552.
- Armoiry X, Kan A, Melendez-Torres GJ, Court R, Sutcliffe P, Auguste P, Madan J, Counsell C, Clarke A. Short- and long-term clinical outcomes of use of beta-interferon or glatiramer acetate for people with clinically isolated syndrome: a systematic review of randomised controlled trials and network meta-analysis. *J Neurol.* 2018 Jan 22. doi: 10.1007/s00415-018-8752-8.ttl
- Asai A, Nakano T, Takahashi M, Nagao A. Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J Agric Food Chem.* 2005 Sep 7;53(18):7302-6.
- Ascherio A, Munger KL. Not too late to take vitamin D supplements. *Ann Neurol.* 2014 Sep;76(3):321-2.
- Aschoff S. Beiträge sur kenntnis des safrans. *Berl. Jb. Pharm.* 1818;19:142-157.
- Asdaq SM, Inamdar MN. Potential of *Crocus sativus* (saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010 Sep;162(2):358-72.
- Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytother Res.* 2005 Nov;19(11):997-1000.
- Ayatollahi H, Javan AO, Khajedaluee M, Shahroodian M, Hosseinzadeh H. Effect of *Crocus sativus* L. (saffron) on coagulation and anticoagulation systems in healthy volunteers. *Phytother Res.* 2014 Apr;28(4):539-43.

## B

- Badía X, Diaz-Prieto A, Gorriz M, Herdman M, Torrado H, Farrero E, Cavanilles J. Using the EuroQol-5D to measure changes in quality of life 12 months after discharge from an intensive care unit. *Intensive Care Medical* 2001; 27: 1901-1907.
- Badia X, Baró E. Health questionnaires in Spain and their use in primary care. *Aten Primaria.* 2001 Sep 30;28(5):349-56.

- Bagert B, Camplair P, Bourdette D. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: natural history, pathophysiology and management. *CNS Drugs*.2002;16(7):445-55.
- Bagheri M, Maghsoudi Z, Fayazi S, Elahi N, Tabesh H, Majdinasab N. Several food items and multiple sclerosis: A case-control study in Ahvaz (Iran). *Iran J Nurs Midwifery Res*. 2014 Nov;19(6):659-65.
- Bagur MJ, Murcia MA, Jiménez-Monreal AM, Tur JA, Bibiloni MM, Alonso GL, Martínez-Tomé M. Influence of Diet in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Adv Nutr*. 2017a May 15;8(3):463-472.
- Bagur MJ, Alonso Salinas GL, Jiménez-Monreal AM, Chaouqi S, Llorens S, Martínez-Tomé M, Alonso GL. Saffron: An Old Medicinal Plant and a Potential Novel. Functional Food. *Molecules*. 2017b Dec 23;23(1).
- Bahmani M, Rafieian M, Baradaran A, Rafieian S, Rafieian-Kopaei M. Nephrotoxicity and hepatotoxicity evaluation of *Crocus sativus* stigmas in neonates of nursing mice. *J. Nephropathol*. 2014; 3: 81–85.
- Bakshi H, Sam S, Rozati R, Sultan P, Islam T, Rathore B, Lone Z, Sharma M, Tripathi J, Saxena RC. DNA fragmentation and cell cycle arrest: a hallmark of apoptosis induced by crocin from Kashmiri saffron in a human pancreatic cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11(3):675-9.
- Bandaru VV, Haughey NJ. Quantitative detection of free 24S-hydroxycholesterol, and 27-hydroxycholesterol from human serum. *BMC Neurosci*. 2014 Dec 24;15:137.
- Basker D. Saffron chemistry. En: Saffron. *Crocus sativus* L. Medicinal and aromatic plants. Industrial profiles. Amsterdam, The Netherlands: Negbi M. Ed., Harwood Academic publishers; 1999.
- Bathaie SZ, Hoshyar R, Miri H, Sadeghizadeh M. Anticancer effects of crocetin in both human adenocarcinoma gastric cancer cells and rat model of gastric cancer. *Biochem Cell Biol*. 2013 Dec;91(6):397-403.
- Becerra Bulla F. Tendencias actuales en la valoración antropométrica del anciano. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* 2006;54:283-9.
- Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol*. 2015 Mar;14(3):263-73.
- Benedetti MG, Piperno R, Simoncini L, Bonato P, Tonini A, Giannini S. Gait abnormalities in minimally impaired multiple sclerosis patients: Multiple Sclerosis.1999; 5: 363-68.
- Benito-León J, Morales JM, Rivera-Navarro A, Mitchell AJ (2003) A review about the impact of multiple sclerosis on health-related quality of life. *Disabil Rehabil* 2003;25(23):1291-303.
- Besler H.T., Comoğlu S., Okçu Z. Serum levels of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Nutr. Neurosci*. 2002;5:215–220.
- Bi X, Lim J, Henry CJ. Spices in the management of diabetes mellitus. *Food Chem*. 2017 Feb 15;217:281-93.
- Bisti S, Maccarone R, Falsini B. Saffron and retina: neuroprotection and pharmacokinetics. *Vis Neurosci*. 2014 Sep;31(4-5):355-61.
- Bitarafan S, Harirchian MH, Nafissi S, Sahraian MA, Togha M, Siassi F, Saedisomeolia A, Alipour E, Mohammadpour N, Chamary M, Honarvar NM, Saboor-Yaraghi AA.

- Dietary intake of nutrients and its correlation with fatigue in multiple sclerosis patients. *Iran J Neurol*. 2014;13(1):28-32.
- Bitarafan S, Saboor-Yaraghi A, Sahraian MA, Nafissi S, Togha M, Beladi Moghadam N, Roostaei T, Siassi F, Eshraghian MR, Ghanaati H, Jafarirad S, Rafiei B, Harirchian MH. Impact of Vitamin A Supplementation on Disease Progression in Patients with Multiple Sclerosis. *Arch Iran Med*. 2015 Jul;18(7):435-40.
- Bittar M, de Souza MM, Yunes RA, Lento R, Delle Monache F, Cechinel Filho V. Antinociceptive activity of I3,I18-binarigenin, a biflavonoid present in plants of the guttiferaceae. *Planta Med*. 2000 Feb;66(1):84-6.
- Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1845(1):20-30.
- Bonet ML, Canas JA, Ribot J, Palou A. Carotenoids in Adipose Tissue Biology and Obesity. *Subcell Biochem*. 2016;79:377-414
- Bonnaud V, Parratte B, Amarenco G, Jackowski D, Didier JP, Guyatt G. Measuring quality of life in multiple sclerosis patients with urinary disorders using the Qualiveen questionnaire. *Arch Phys Med Rehabil*. 2004 Aug;85(8):1317-23.
- Brazier JE, Roberts J. The estimation of a preference-based measure of health from the SF-12. *Med care*. 2004 Sep;42(9):851-9.
- Brinker FJ. *Herb Contraindications and Drug Interactions*. 2nd ed. Sandy, OR: Eclectic Medical Publications; 1998.
- Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. 1995 Dec;9(15):1551-8.
- Brooks R. Quality of life measures. *Crit Care Med*. 1996 Oct;24(10):1769.
- Brunet DG, Hopman WM, Singer MA, Edgar CM, McKenzie TA. Measurement of health-related quality of life in multiple sclerosis patients. *Can J Neurol Sci* 1996; 23: 99-103.
- Bruyere O, Wuidart MA, Di Palma E, Gourlay M, Ethgen O, Richy F, Reginster JY. Controlled whole body vibration to decrease fall risk and improve health-related quality of life of nursing home residents. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005 Feb;86(2):303-7.
- Bueno AM, Sayao AL, Yousefi M, Devonshire V, Traboulee A, Tremlett H. Health-related quality of life in patients with longstanding 'benign multiple sclerosis'. *Mult Scler Relat Disord*. 2015;4(1):31-8.
- Burgos R, Bretón I, Cereda E, Desport JC, Dziewas R, Genton L, Gomes F, Jésus P, Leischker A, Muscaritoli M, Poulia KA, Preiser JC, Van der Marck M, Wirth R, Singer P, Bischoff SC. ESPEN guideline clinical nutrition in neurology. *Clin Nutr*. 2018 Feb;37(1):354-396.

## C

- Caan BJ, Lanza E, Schatzkin A, Coates AO, Brewer BK, Slattery ML, Marshall JR, Bloch A. Does nutritionist review of a self-administered food frequency questionnaire improve data quality?. 1999 Dec;2(4):565-9.
- Calandri E, Graziano F, Borghi M, Bonino S. Improving the quality of life and psychological well-being of recently diagnosed multiple sclerosis patients: preliminary evaluation of a group-based cognitive behavioral intervention. *Disabil Rehabil*. 2017 Jul;39(15):1474-1481.

- Callaghan BC, Hur J, Feldman EL. Diabetic neuropathy: one disease or two? *Curr Opin Neurol*. 2012 Oct;25(5):536-41.
- Campo CP, Carmona M, Maggi L, Kanakis CD, Anastasaki EG, Tarantilis PA, Polissiou MG, Alonso GL. Effects of mild temperature conditions during dehydration procedures on saffron quality parameters. *J Sci Food Agric*. 2010; 90(4):719-25.
- Carmona M, Zalacain A, Alonso GL. *The Chemical Composition of Saffron: Color, Taste and Aroma*. 1th ed. Albacete, Spain: Bomarzo SL; 2006a.
- Carmona M, Zalacain A, Salinas MR, Alonso GL. A new approach to saffron aroma. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007; 47(2):145-59.
- Carranco Jáuregui ME, Calvo Carrillo Mde L, Romo FP. [Carotenoids and their antioxidant function: a review]. *Arch Latinoam Nutr*. 2011 Sep;61(3):233-41.
- Carvalho KS, Grunwald T, De Luca F. Neurological Complications of Endocrine Disease. *Semin Pediatr Neurol*. 2017 Feb;24(1):33-42.
- Cattaneo D, De Nuzzo C, Fascia T, Macalli M, Pisoni I, Cardini R. Risks of falls in subjects with multiple sclerosis. *Arch Phys Med J*. 2002 Jun;83(6):864-7.
- Chan S, Kingwell E, Oger J, Yoshida E, Tremlett H. High-dose frequency beta-interferons increase the risk of liver test abnormalities in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Mult Scler*. 2011 Mar;17(3):361-7.
- Chumlea WC. Is the MNA valid in different populations and across practice settings? *J Nutr Health Aging*. 2006 Nov-Dec;10(6):524-7.
- Chruzander C, Ytterberg C, Gottberg K, Einarsson U, Widén Holmqvist L, Johansson S. A 10-year follow-up of a population-based study of people with multiple sclerosis in Stockholm, Sweden: changes in health-related quality of life and the value of different factors in predicting health-related quality of life. *J Neurol Sci*. 2014 Apr 15;339(1-2):57-63.
- Chryssanthi DG, Lamari FN, Georgakopoulos CD, Cordopatis P. A new validated SPE-HPLC method for monitoring crocetin in human plasma--application after saffron tea consumption. *J Pharm Biomed Anal*. 2011 Jun 1; 55(3):563-8.
- Cohen JA, Hunter SF, Brown TR, Gudesblatt M, Thrower BW, Llorens L, Souza-Prien CJ, Ruby AE, Chernoff DN, Patni R. Safety and efficacy of ADS-5102 (amantadine) extended release capsules to improve walking in multiple sclerosis: A randomized, placebo-controlled, phase 2 trial. *Mult Scler*. 2018 Jan 1:1352458518754716. doi: 10.1177/1352458518754716.
- Colegio Oficial de Farmacéuticos de España. *Catálogo de Plantas Medicinales*; Colegio Oficial de Farmacéuticos de España: Madrid, Spain, 2011.
- Collin C, Wade DT, Davies S, Horne V. The Barthel ADL index: A reliability study. *Int Disabil Studies* 1988;10:61-63.k
- Cook AW, Gupta JK, Pertschuk LP, Nidzgorski F. Multiple sclerosis and malabsorption. *Lancet*. 1978 Jun 24;1(8078):1366.
- Coote S, Gallagher S, Msetfi R, Larkin A, Newell J, Motl RW, Hayes S. A randomised controlled trial of an exercise plus behaviour change intervention in people with multiple sclerosis: the step it up study protocol. *BMC Neurol*. 2014 Dec 21;14:241.
- Corcoran MP, Lamon-Fava S, Fielding RA. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am J Clin Nutr*. 2007 Mar;85(3):662-77.

- Corradi C, Micheli G. Determinazione spettrofotometrica del potere clorante, amaricante ed odoroso dello zafferano. *Boll Chim Farm.* 1979; 118: 553-562.
- Corvalán C, Uauy R, Kain J, Martorell R. Obesity indicators and cardiometabolic status in 4-y-old children. *Am J Clin Nutr.* 2010 Jan;91(1):166-74.
- Cossignani L, Urbani E, Simonetti MS, Maurizi A, Chiesi C, Blasi F. Characterisation of secondary metabolites in saffron from central Italy (Cascia, Umbria). *Food Chem.* 2014 Jan 15;143:446-51.
- Coyle PK. Symptom Management and Lifestyle Modifications in Multiple Sclerosis. *Continuum (Minneapolis, Minn).* 2016 Jun;22(3):815-36.
- Cutajar R, Ferriani E, Scandellari C, Sabattini L, Trocino C, Marchello LP, Stecchi S. Cognitive function and quality of life in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol.* 2000 May;6 Suppl 2:S186-90.
- Çam M, İçyer N. Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. *J Food Sci Technol.* 2015 Mar;52(3):1489-97.

## D

- Das I., Das S., Saha T. Saffron suppresses oxidative stress in DMBA-induced skin carcinoma: A histopathological study. *Acta Histochemica.* 2010;112(4):317-27.
- Dhar A, Mehta S, Dhar G, Dhar K, Banerjee S, Van Veldhuizen P, Campbell DR, Banerjee SK. Crocetin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and tumor progression in a xenograft mouse model. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2009 Feb;8(2):315-23.
- D'Alessandro AM, Mancini A, Lizzi AR, De Simone A, Marroccella CE, Gravina GL, Tatone C, Festuccia C. *Crocus sativus* stigma extract and its major constituent crocin possess significant antiproliferative properties against human prostate cancer. *Nutr Cancer.* 2013;65(6):930-42.
- De Koning L, Merchant AT, Pogue J, Anand SS. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur Heart J.* 2007 Apr;28(7):850-6.
- De Monte C, Carradori S, Chimenti P, Secci D, Mannina L, Alcaro F, Petzer A, N'Da CI, Gidaro MC, Costa G, Alcaro S, Petzer JP. New insights into the biological properties of *Crocus sativus* L.: chemical modifications, human monoamine oxidases inhibition and molecular modeling studies. *Eur J Med Chem.* 2014 Jul 23;82:164-71.
- Decker F. Beiträge zur Kenntnis des Crocetins. *Arch. Pharm.* 1914; 252: 139–160.
- Deslauriers AM, Afkhami-Goli A, Paul AM, Bhat RK, Acharjee S, Ellestad KK, Noorbakhsh F, Michalak M, Power C. Neuroinflammation and endoplasmic reticulum stress are coregulated by crocin to prevent demyelination and neurodegeneration. *J Immunol.* 2011 Nov 1;187(9):4788-99.
- Dettmers C, Sulzmann M, Ruchay-Plössl A, Gütler R, Vieten M. Endurance exercise improves walking distance in MS patients with fatigue. *Acta Neurol Scand.* 2009 Oct;120(4):251-7.
- Dionysiotis Y. Body composition in multiple sclerosis. *Hippokratia.* 2013 Jan;17(1):7-11.

- DiLuccio RC, Gainer JL. Increasing alveolar oxygen transport. *Aviat Space Environ Med.* 1980;51(1):18-20.
- Dudet M. Estimación de la altura corporal en población española menor de 60 años. *Rev Esp Nutr Comunitaria.* 2004; 10: 74-81.
- Dutta S, Bhattacharjee P. Enzyme-assisted supercritical carbon dioxide extraction of black pepper oleoresin for enhanced yield of piperine-rich extract. *J Biosci Bioeng.* 2015 Jul;120(1):17-23.
- Dörr J, Ohlraun S, Skarabis H, Paul F. Efficacy of vitamin D supplementation in multiple sclerosis (EVIDIMS Trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2012 Feb 8;13:15.

## E

- Einarsson U, Gottberg K, Fredriksson S, von Koch L, Widén Holmqvist L. Activities of daily living and social activities in people with multiple sclerosis in Stockholm County. *Clin Rehabil.* 2006; 20:543–551
- Elizondo RA, Karmonik C, Boone TB, Khavari R. Protocol for a prospective observational study of cortical lower urinary tract control changes following intradetrusor injection of botulinum toxin-A in patients with multiple sclerosis. *BMJ Open.* 2017 Feb 3;7(2):e013225. doi: 10.1136/bmjopen-2016-013225.
- Erdman JW Jr, Bierer TL, Gugger ET. Absorption and transport of carotenoids. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Dec 31; 691:76-85.
- Ernst E. Herbal medicinal products during pregnancy: are they safe? *BJOG .* 2002;109(3):227-235.
- Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett.* 1996 Feb 27;100(1-2):23-30.

## F

- Faber MJ, Bosscher RJ, Van Wieringen PCW. Clinimetric Properties of the Performance-Oriented Mobility Assessment. *Phys Ther.* 2006; 86(7):944-54.
- Falsini B, Piccardi M, Minnella A, Savastano C, Capoluongo E, Fadda A, et al. Influence of saffron supplementation on retinal flicker sensitivity in early age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(12):6118–24
- Fanciullacci C, Straudi S, Basaglia N, Chisari C. The role of psychological well being in multiple sclerosis rehabilitation. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2017 Feb;53(1):105-113
- Fantelli FJ, Mitsumoto H, Sebek BA. Multiple sclerosis and malabsorption. *Lancet.* 1978 May 13;1(8072):1039-40.
- Farahmand SK, Samini F, Samini M, Samarghandian S. Safranal ameliorates antioxidant enzymes and suppresses lipid peroxidation and nitric oxide formation in aged male rat liver. *Biogerontology.* 2013 Feb;14(1):63-71.
- Farez MF, Fiol MP, Gaitán MI, Quintana FJ, Correale J. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015 Jan;86(1):26-31.
- Farez MF. Salt intake in multiple sclerosis: friend or foe? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016 Dec;87(12):1276.

- Farinotti M, Vacchi L, Simi S, Di Pietrantonj C, Brait L, Filippini G. Dietary interventions for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Dec 12;12:CD004192. doi: 10.1002/14651858.CD004192.pub3.
- Farokhnia M, Shafiee Sabet M, Iranpour N, Gougol A, Yekehtaz H, Alimardani R, Farsad F, Kamalipour M, Akhondzadeh S. Comparing the efficacy and safety of *Crocus sativus* L. with memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease: a double-blind randomized clinical trial. *Hum Psychopharmacol*. 2014 Jul;29(4):351-9.
- Fernández O, Fernández VE, Guerrero M. *Esclerosis Múltiple*. 2.ª Edición. Madrid, Spain: Edit McGraw-Hill.Interamericana; 2005.
- Fernández O, Fernández VE. *Esclerosis múltiple*. Concepto. Etiopatogenia. Fisiopatología. Manifestaciones clínicas. Investigaciones paraclínicas. Diagnóstico. Historia natural. *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, ISSN 0304-5412, Serie 9, Nº. 76, 2007 (Ejemplar dedicado a: Enfermedades del sistema nervioso (VII)), págs. 4867-4877
- Ferraro D, Franciotta D, Bedin R, Solaro C, Cocco E, Santangelo M, Immovilli P, Gajofatto A, Calabrese M, Di Filippo M, Orlandi R, Simone AM, Vitetta F, Capello E, Giunti D, Murialdo A, Frau J, Mariotto S, Gallina A, Gasperini C, Sola P. RIREMS group (Rising Italian Researchers in Multiple Sclerosis). *J Neurol*. 2017 Apr 5. doi: 10.1007/s00415-017-8480-5.
- Ferrence SC, Bendersky G. Therapy with saffron and the goddess at Thera. *Perspect Biol Med*. 2004 Spring; 47(2):199-226.
- Festi D, Scafoli E, Baldi F, Vestito A, Pasqui F, Di Biase AR, Colecchia A. Body weight, lifestyle, dietary habits and gastroesophageal reflux disease. 2009 Apr 14;15(14):1690-701.
- Festuccia C, Mancini A, Gravina GL, Scarsella L, Llorens S, Alonso GL, Tatone C, Di Cesare E, Jannini EA, Lenzi A, D'Alessandro AM, Carmona M. Antitumor effects of saffron-derived carotenoids in prostate cancer cell models. *Biomed Res Int*. 2014;2014:135048.
- Fiest KM, Fisk JD, Patten SB, Tremlett H, Wolfson C, Warren S, McKay KA, Berrigan L, Marrie RA; CIHR Team in the Epidemiology and Impact of Comorbidity on Multiple Sclerosis (EcoMS). Comorbidity is associated with pain-related activity limitations in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2015 Sep;4(5):470-6.
- Fiest KM, Greenfield J, Metz LM, Patten SB, Jetté N, Marrie RA. Discriminative ability of quality of life measures in multiple sclerosis. *Health Qual Life Outcomes*. 2017 Dec 21;15(1):246.
- Fishman P. Detecting malnutrition's warning signs with simple screening tools. *Geriatrics*. 1994 Oct;49(10):39-42.
- Flachenecker P. Evolution of multiple sclerosis spasticity-associated symptoms: latest data. *Neurodegener Dis Manag*. 2016 Dec;6(6s):9-12.
- Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998 Jan;22(1):39-47.
- Flores-Alvarado LJ, Gabriel-Ortiz G, Pacheco-Mois FP, Bitzer-Quintero K. [Pathogenic mechanisms of neuronal damage in multiple sclerosis]. *Invest Clin*. 2015 Jun;56(2):201-14.

- Formica CA, Cosman F, Nieves J, Herbert J, Lindsay R. Reduced bone mass and fat-free mass in women with multiple sclerosis: effects of ambulatory status and glucocorticoid Use. *Calcif Tissue Int.* 1997 Aug;61(2):129-33.
- Francis GS, Grumser Y, Alteri E, Micaleff A, O'Brien F, Alsop J, Stam Moraga M, Kaplowitz N. Hepatic reactions during treatment of multiple sclerosis with interferon-beta-1a: incidence and clinical significance. *Drug Saf.* 2003;26(11):815-27.
- Frau J, Coghe G, Loreface L, Fenu G, Cadeddu B, Marrosu MG, Cocco E. Attitude towards physical activity in patients with multiple sclerosis: a cohort study. *Neurol Sci.* 2015 Jun;36(6):889-93.
- Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Ohman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJ, Sellebjerg F, Tourtellotte WW. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol.* 2005 Jun;62(6):865-70.
- Fricska-Nagy Z, Füvesi J, Rózsa C, Komoly S, Jakab G, Csépany T, Jobbágy Z, Lencsés G, Vécsei L, Bencsik K. The effects of fatigue, depression and the level of disability on the health-related quality of life of glatiramer acetate-treated relapsing-remitting patients with multiple sclerosis in Hungary. *Mult Scler Relat Disord.* 2016 May;7:26-32.

## G

- Gainer JL, Chisolm GM. Oxygen diffusion and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1974;19(1): 135-8.
- Gainer, J.L. y Jones, J.R. 1975. *Experientia* 31: 548-549. Gainer JL, Jones JR. The use of crocetin in experimental atherosclerosis. *Experientia.* 1975 May 15;31(5):548-9.
- Gainer JV Jr, Nugent R. Effect of increasing the plasma oxygen diffusivity on experimental cryogenic edema. *J Neurosurg.* 1976 Nov;45(5):535-8.
- Gainer JL, Rudolph DB, Caraway DL. The effect of crocetin on hemorrhagic shock in rats. *Circ Shock.* 1993 Sep;41(1):1-7.
- Gainer JL, Stennett AK, Murray RJ. The effect of trans sodium crocetinate (TSC) in a rat oleic acid model of acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005;18(3):213-6.
- Gainer JL. Trans-sodium crocetinate for treating hypoxia/ischemia. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008 Jun;17(6):917-24.
- Gainer JL, Sheehan JP, Lerner JM, Jones DR. Trans sodium crocetinate with temozolomide and radiation therapy for glioblastoma multiforme. *J Neurosurg.* 2017 Feb;126(2):460-466.
- García-Diz L, Sierra JL, Mataix J. *Informativ ADN: Alimentation, Dietetic and Nutrition.* Version 4.0. Spain: University Complutense of Madrid. 2009.
- García-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontañón J, Fernandez JA, Atiénzar M, García-Olmo D. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): an experimental study in the rat. *Nutr Cancer.* 1999;35(2):120-6.
- Garcia Merino A, Blasco MR. Confirming the MS diagnosis. *Int MS J.* 2007 Jun;14(2):58-63.

- García-Merino A, Fernández O, Montalbán X, de Andrés C, Oreja-Guevara C, Rodríguez-Antigüedad A, Arbizu T; Grupo de Consenso de la Sociedad Española de Neurología. Consensus Statement on medication use in multiple sclerosis by the Spanish Society of Neurology's study group for demyelinating diseases. *Neurologia*. 2013 Jul-Aug;28(6):375-8.
- García-Rodríguez MV, Serrano-Díaz J, Tarantilis PA, López-Córcoles H, Carmona M, Alonso GL. Determination of saffron quality by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 2014 Aug 13; 62(32):8068-74.
- García-Rodríguez MV, López-Córcoles H, Alonso GL, Pappas CS, Polissiou MG, Tarantilis PA. Comparative evaluation of an ISO 3632 method and an HPLC-DAD method for safranal quantity determination in saffron. *Food Chem*. 2017 Apr 15;221:838-843.
- Garnett SP, Baur LA, Srinivasan S, Lee JW, Cowell CT. Body mass index and waist circumference in midchildhood and adverse cardiovascular disease risk clustering in adolescence. *Am J Clin Nutr*. 2007 Sep;86(3):549-55.
- Gay MC, Bungener C, Thomas S, Vrignaud P, Thomas PW, Baker R, Montel S, Heinzlef O, Papeix C, Assouad R, Montreuil M. Anxiety, emotional processing and depression in people with multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2017 Feb 23;17(1):43.
- Gervasoni E, Cattaneo D, Montesano A, Jonsdottir J. Effects of fatigue on balance and mobility in subjects with multiple sclerosis: a brief report. *ISRN Neurol*. 2012;2012:316097. doi: 10.5402/2012/316097.
- Ghaffari Sh, Hatami H, Dehghan G. Saffron ethanolic extract attenuates oxidative stress, spatial learning, and memory impairments induced by local injection of ethidium bromide. *Res Pharm Sci*. 2015 May-Jun;10(3):222-32.
- Ghajar A, Neishabouri SM, Velayati N, Jahangard L, Matinnia N, Haghighi M, Ghaleiha A, Afarideh M, Salimi S, Meysamie A, Akhondzadeh S. *Crocus sativus* L. versus Citalopram in the Treatment of Major Depressive Disorder with Anxious Distress: A Double-Blind, Controlled Clinical Trial. *Pharmacopsychiatry*. 2017 Jul;50(4):152-160.
- Ghazavi A, Mosayebi G, Salehi H, Abtahi H. Effect of ethanol extract of saffron (*Crocus sativus* L.) on the inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57bl/6 mice. *Pak J Biol Sci*. 2009 May 1;12(9):690-5.
- Giassi LJ, Poynter AK, Gainer JL. Trans sodium crocetin for hemorrhagic shock: effect of time delay in initiating therapy. *Shock*. 2002 Dec;18(6):585-8.
- Ginwala R, McTish E, Raman C, Singh N, Nagarkatti M, Nagarkatti P, Sagar D, Jain P, Khan ZK. Apigenin, a Natural Flavonoid, Attenuates EAE Severity Through the Modulation of Dendritic Cell and Other Immune Cell Functions. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2016 Mar;11(1):36-47.
- Giubilei F, Antonini G, Di Legge S, Sormani MP, Pantano P, Antonini R, Sepe-Monti M, Caramia F, Pozzilli C. Blood cholesterol and MRI activity in first clinical episode suggestive of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2002 bAug;106(2):109-12.
- Goldberg R. The business of agriceuticals. *Nat Biotechnol*. 1999; 17 (Supl.): BV5-6.
- González-González L, Pérez-Cortéz JG, Flores-Aldana M, Macías-Morales N, Hernández- Girón C. Antioxidant use as dietary therapy in patients with multiple sclerosis. *Medwave* 2015 Ene;15(1):e6065 doi: 10.5867.
- Goodkin DE. EDSS reliability. *Neurology*. 1991 Feb;41(2 ( Pt 1)):332.

- Goodin DS, Biermann LD, Bohlega S, Boiko A, Chofflon M, Gebeily S, Gouider R, Havrdova E, Jakab G, Karabudak R, Karussis D, Miller A, Pakdaman H, Selmaj K, Sharief M; International Working Group for Treatment Optimization in MS. Integrating an evidence-based assessment of benefit and risk in disease-modifying treatment of multiple sclerosis. *Curr Med Res Opin.* 2007 Nov;23(11):2823-32.
- Gout B, Bourges C, Paineau-Dubreuil S. Satiereal, a *Crocus sativus* L extract, reduces snacking and increases satiety in a randomized placebo-controlled study of mildly overweight, healthy women. *Nutr Res.* 2010 May;30(5):305-13.
- Guijarro-Castro C., Moreno-García S., Bermejo-Pareja F., Benito-León J. Calidad de vida relacionada con la salud en Esclerosis Múltiple. *Revista Española de Esclerosis Múltiple.* 2010;13:17–23.
- Gutheil WG, Reed G, Ray A, Anant S, Dhar A. Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Jan;13(1):173-9.
- Gutierrez GM, Chow JW, Tillman MD, McCoy SC, Castellano V, White LJ. Resistance training improves gait kinematics in persons with multiple sclerosis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005 Sep;86(9):1824-9.
- Granado F, Olmedilla B, Herrero C, Pérez-Sacristán B, Blanco I, Blázquez S. Bioavailability of carotenoids and tocopherols from broccoli: in vivo and in vitro assessment. *Exp Biol Med.* 2006 Dec; 231(11):1733-8.

## H

- Hadgkiss EJ, Jelinek GA, Weiland TJ, Rumbold G, Mackinlay CA, Gutbrod S, Gawler I. Health-related quality of life outcomes at 1 and 5 years after a residential retreat promoting lifestyle modification for people with multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2013;34(2):187-95
- Hadgkiss EJ, Jelinek GA, Weiland TJ, Pereira NG, Marck CH, van der Meer DM. The association of diet with quality of life, disability, and relapse rate in an international sample of people with multiple sclerosis. *Nutr Neurosci.* 2015 Apr;18(3):125-36.
- Handels RL, Xu W, Rizzuto D, Caracciolo B, Wang R, Winblad B, Verhey FR, Severens JL, Fratiglioni L, Joore MA, Wimo A. Natural progression model of cognition and physical functioning among people with mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*2013;37(2):357-65.
- Hardingham GE, Lipton SA. Regulation of neuronal oxidative and nitrosative stress by endogenous protective pathways and disease processes. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Apr 15;14(8):1421-4.
- Hausenblas HA, Saha D, Dubyak PJ, Anton SD. Saffron (*Crocus sativus* L.) and major depressive disorder: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Integr Med.* 2013 Nov;11(6):377-83.
- Hawton A, Green C. Health Utilities for Multiple Sclerosis. *Value Health.* 2016 Jun;19(4):460-8.

- He K, Si P, Wang H, Tahir U, Chen K, Xiao J, Duan X, Huang R, Xiang G. Crocetin induces apoptosis of BGC-823 human gastric cancer cells. *Mol Med Rep.* 2014 Feb;9(2):521-6.
- Heaney RP Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. *J Nutr.* 2001;131: 1344–1348.
- Hechtner MC, Vogt T, Zöllner Y, Schröder S, Sauer JB, Binder H, Singer S, Mikolajczyk R. Quality of life in Parkinson's disease patients with motor fluctuations and dyskinesias in five European countries. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 Sep;20(9):969-74.
- Heiskanen S, Meriläinen P, Pietilä AM. Health-related quality of life-testing the reliability of the MSQOL-54 instrument among MS patients. *Scand J Caring Sci.* 2007 Jun;21(2):199-206.
- Hejazi E, Amani R, SharafodinZadeh N, Cheraghian B. Comparison of Antioxidant Status and Vitamin D Levels between Multiple Sclerosis Patients and Healthy Matched Subjects. *Mult Scler Int.* 2014;2014:539854.
- Henriksson F1, Fredrikson S, Masterman T, Jönsson B. Costs, quality of life and disease severity in multiple sclerosis: a cross-sectional study in Sweden. *Eur J Neurol.* 2001 Jan;8(1):27-35.
- Herdman M, Badia X, Berra S.[EuroQol-5D: a simple alternative for measuring health-related quality of life in primary care]. *Aten Primaria.* 2001 Oct 15;28(6):425-30.
- Hermsdorff H., Puchau B., Volp A., Barbosa K., Bressan J., Zulet M.Á., Martínez J.A. Dietary total antioxidant capacity is inversely related to central adiposity as well as to metabolic and oxidative stress markers in healthy young adults. *Nutr. Metab. (Lond.)* 2011;8 doi: 10.1186/1743-7075-8-59.
- Heymsfields. *Composición corporal.* 1ª Edición. 2007. Ed. McGraw-Hill México.
- Hill J, Fillit H, Thomas SK, Chang S. Functional impairment, healthcare costs and the prevalence of institutionalisation in patients with Alzheimer's disease and other dementias. *Pharmaeconomics.* 2006;24(3):265-80.
- Himes JH. Challenges of accurately measuring and using BMI and other indicators of obesity in children. *Pediatrics.* 2009; 124: S3-22.
- Himeno H, Sano K. Synthesis of crocin, picrocrocine and safranal by saffron stigma-like structures proliferated in vitro. *Agric. Biol. Chem.* 1987; 9(21): 2395-400.
- Hobart J, Freeman J, Thompson A. Kurtzke scales revisited: the application of psychometric methods to clinical intuition. *Brain.* 2000 May;123 ( Pt 5):1027-40.
- Holloway GM, Gainer JL. The carotenoid crocetin enhances pulmonary oxygenation. *J Appl Physiol* (1985). 1988 Aug;65(2):683-6.
- Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinshenker BG. The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc.* 1997 Sep;72(9):871-8.
- Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol.* 2002 Mar 15;2:7.
- Hosseinzadeh H, Talebzadeh F. Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* in mice. *Fitoterapia.* 2005 Dec;76(7-8):722-4.
- Hosseinzadeh H, Ghenaati J. Evaluation of the antitussive effect of stigma and petals of saffron (*Crocus sativus*) and its components, safranal and crocin in guinea pigs. *Fitoterapia.* 2006 Sep;77(6):446-8.

- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Effect of safranal, a constituent of *Crocus sativus* (saffron), on methyl methanesulfonate (MMS)-induced DNA damage in mouse organs: an alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay. *DNA Cell Biol.* 2007b Dec;26(12):841-6.
- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Protective effect of safranal on pentylenetetrazol-induced seizures in the rat: Involvement of GABAergic and opioids systems. *Phytomedicine*, 2007 Apr; 14: 256–262.
- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Rahimi A. Effect of safranal on extracellular hippocampal levels of glutamate and aspartate during kainic Acid treatment in anesthetized rats. *Planta Med.* 2008 Oct; 74(12):1441-5
- Hosseinzadeh H, Noraei NB. Anxiolytic and hypnotic effect of *Crocus sativus* aqueous extract and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Phytoter. Res.* 2009 Jun; 23: 768–774.
- Hosseinzadeh H, Nassiri-Asl M. Avicenna's (Ibn Sina) the Canon of Medicine and saffron (*Crocus sativus*): a review. *Phytother Res.* 2013 Apr;27(4):475-83.
- Hänsel R. Medizinische empire und modern Arzneimittelforschung. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 1977; 177: 1672-79.

## I

- International Organization for Standardization (ISO). ISO 3632-1 Saffron (*Crocus sativus*.L). Part 1 (Specification) and Part 2 (Test Methods); ISO: Geneva, Switzerland, 2011.
- Imenshahidi M, Hosseinzadeh H, Javadpour Y. Hypotensive effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and its constituents, safranal and crocin, in normotensive and hypertensive rats. *Phytother Res.* 2010 Jul;24(7):990-4.
- IUPAC. Nomenclature of Carotenoids (Rules Approved 1974); Issued by the IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUB Commission on Biochemical Nomenclature; Buters Worths: London, UK, 1974.

## J

- Jabbarporr Bonyadi MH, Yazdani S, Saadat S. The ocular hypotensive effect of saffron extract in primary open angle glaucoma: A pilot study. *BMC Complement. Altern. Med.* 2014; 14 (1): 1-21.
- Jahromi SR, Toghae M, Jahromi MJ, Aloosh M. Dietary pattern and risk of multiple sclerosis. *Iran J Neurol.* 2012;11(2):47-53.
- Jamroz-Wisniewska A, Beltowski J, Stelmasiak Z, Bartosik-Psujek H. Paraoxonase 1 activity in different types of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2009; 15(3):399-402.
- Janardhan V, Bakshi R. Quality of life in patients with multiple sclerosis: The impact of fatigue and depression. *J Neurol. Sci.* 2002 Dec; 205(1): 51-58.
- Janssens AC, van Doorn PA, de Boer JB, van der Meche FG, Passchier J, Hintzen RQ. Impact of recently diagnosed multiple sclerosis on quality of life, anxiety, depression and distress of patients and partners. *Acta Neurol Scand* 2003; 108: 389-395.
- Jelinek GA, Hadgkiss EJ, Weiland TJ, Pereira NG, Marck CH, van der Meer DM. Association of fish consumption and  $\Omega$  3 supplementation with quality of

life, disability and disease activity in an international cohort of people with multiple sclerosis. *Int J Neurosci*. 2013 Nov;123(11):792-800.

Jung HB, Choi DK, Lee SH, Cho ST, Na HR, Park MH. Correlation between overactive bladder symptom score and neuropsychological parameters in Alzheimer's disease patients with lower urinary tract symptom. *Int Braz J Urol*. 2017 Mar-Apr;43(2):256-263.

## K

Kamalian N, Keeseey RE, ZuRhein GM. Lateral hypothalamic demyelination and cachexia in a case of "malignant" multiple sclerosis. *Neurology*. 1975 Jan;25(1):25-30.

Kamalipour M, Akhondzadeh S. Cardiovascular effects of saffron: an evidence-based review. *J Tehran Heart Cent*. 2011 Spring;6(2):59-61.

Kampman MT, Wilsgaard T, Mellgren SI. Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *J Neurol*. 2007 Apr;254(4):471-7.

Kampman MT, Steffensen LH, Mellgren SI, Jørgensen L. Effect of vitamin D3 supplementation on relapses, disease progression, and measures of function in persons with multiple sclerosis: exploratory outcomes from a double-blind randomised controlled trial. *Mult Scler*. 2012 Aug;18(8):1144-51.

Kanakis CD, Tarantilis PA, Tajmir-Riahi HA, Polissiou MG. Crocetin, dimethylcrocetin, and safranin bind human serum albumin: stability and antioxidative properties. *J Agric Food Chem*. 2007 Feb 7;55(3):970-7

Kanakis CD, Tarantilis PA, Pappas C, Bariyanga J, Tajmir-Riahi HA, Polissiou MG. An overview of structural features of DNA and RNA complexes with saffron compounds: Models and antioxidant activity. *J Photochem Photobiol B*. 2009 Jun 3;95(3):204-12.

Kang JH, Chen YH, Lin HC. Comorbidities amongst patients with multiple sclerosis: a population-based controlled study. *Eur J Neurol*. 2010 Sep;17(9):1215-9.

Kappos L, Edan G, Freedman MS, Montalbán X, Hartung HP, Hemmer B, Fox EJ, Barkhof F, Schippling S, Schulze A, Pleimes D, Pohl C, Sandbrink R, Suarez G, Wicklein EM; BENEFIT Study Group. The 11-year long-term follow-up study from the randomized BENEFIT CIS trial. *Neurology*. 2016 Sep 6;87(10):978-87.

Karg E, Klivényi P, Németh I, Bencsik K, Pintér S, Vécsei L. Nonenzymatic antioxidants of blood in multiple sclerosis. *J Neurol*. 1999 Jul;246(7):533-9.

Kargarfard M, Etemadifar M, Baker P, Mehrabi M, Hayatbakhsh R. Effect of aquatic exercise training on fatigue and health-related quality of life in patients with multiple sclerosis. *Arch Phys Med Rehabil*. 2012 Oct;93(10):1701-8.

Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Jaafar HZ. Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*. 2010 Sep 6;15(9):6244-56.

Karrer, P.; Salomon, H. Über die Safranfarbstoffe II. (VI. Mitteilung über Pflanzenfarbstoffe). *Helv. Chim. Acta* 1928, 11, 513–525.

Kashani L, Esalatmanesh S, Eftekhari F, Salimi S, Foroughifar T, Etesam F, Safiaghdam H, Moazen-Zadeh E, Akhondzadeh S. Efficacy of *Crocus sativus* (saffron) in treatment of major depressive disorder associated with post-

- menopausal hot flashes: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arch Gynecol Obstet*. 2018 Mar;297(3):717-724.
- Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW. Studies of illness in the aged. the index of adl: a standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA*. 1963 Sep 21;185:914-9.
- Khalili M, Azimi A, Izadi V, Eghtesadi S, Mirshafiey A, Sahraian MA, Motevalian A, Norouzi A, Sanoobar M, Eskandari G, Farhoudi M, Amani F. Does lipoic acid consumption affect the cytokine profile in multiple sclerosis patients: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Neuroimmunomodulation*. 2014;21(6):291-6.
- Khazdair MR, Boskabady MH, Hosseini M, Rezaee R, M Tsatsakis A. The effects of *Crocus sativus* (saffron) and its constituents on nervous system: A review. *Avicenna J Phytomed*. 2015 Sep-Oct;5(5):376-91.
- Khosravi-Largani M, Pourvali-Talatappeh P, Rousta AM, Karimi-Kivi M, Noroozi E, Mahjoob A, Asaadi Y, Shahmohammadi A, Sadeghi S, Shakeri S, Ghiyasvand K, Tavakoli-Yaraki M. A review on potential roles of vitamins in incidence, progression, and improvement of multiple sclerosis. *eNeurologicalSci*. 2018 Jan 28;10:37-44.
- Kianbakht y Ghazabi, 2011 Kianbakht S, Ghazavi A. Immunomodulatory effects of saffron: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Phytother Res*. 2011 Dec;25(12):1801-5.
- Kimball SM, Ursell MR, O'Connor P, Vieth R. Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr*. 2007 Sep;86(3):645-51.
- Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, Muller DN, Hafler DA. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):518-22.
- Ko Ko C. Effectiveness of rehabilitation for multiple sclerosis. *Clin Rehabil* 1999; 13: 33-41
- Kocer B, Engur S, Ak F, Yilmaz M. Serum vitamin B12, folate, and homocysteine levels and their association with clinical and electrophysiological parameters in multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2009 Mar;16(3):399-403.
- Koleva M, Kadiiska A, Markovska V, Nacheva A, Boev M. Nutrition, nutritional behavior, and obesity. 2000 Feb;8(1):10-3.
- Kondrup J, Rasmussen HH, Hamberg O, Stanga Z; Ad Hoc ESPEN Working Group. Nutritional risk screening (NRS 2002): a new method based on an analysis of controlled clinical trials. *Clin Nutr*. 2003 Jun;22(3):321-36.
- Korsen M, Kunz R, Schminke U, Runge U, Kohlmann T, Dressel A. Dalfampridine effects on cognition, fatigue, and dexterity. *Brain Behav*. 2016 Nov 11;7(1):e00559. doi: 10.1002/brb3.559.
- Kubsik A, Klimkiewicz P, Jankowska K, Jankowska A, Woldanska-Okonska M. the influence of high-tone power therapy on the functional status of patients with multiple sclerosis. *Polski Merkuriusz Lekarski* 2014 Jul; 37(217): 24-29.
- Kubsik A, Klimkiewicz R, Janczewska K, Klimkiewicz P, Jankowska A, Woldańska-Okońska M. Application of laser radiation and magnetostimulation in therapy of patients with multiple sclerosis. *NeuroRehabilitation*. 2016;38(2):183-90.

- Kyriakoudi A, Tsimidou MZ, O'Callaghan YC, Galvin K, O'Brien NM. Changes in total and individual crocetin esters upon in vitro gastrointestinal digestion of saffron aqueous extracts. *J Agric Food Chem*. 2013 Jun 5;61(22):5318-27.
- Kyriakoudi A, O'Callaghan YC, Galvin K, Tsimidou MZ, O'Brien NM. Cellular Transport and Bioactivity of a Major Saffron Apocarotenoid, Picrocrocin (4-( $\beta$ -D-Glucopyranosyloxy)-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde). *J Agric Food Chem*. 2015 Oct 7;63(39):8662-8.
- Kuo H, Jones R, Milberg W, Tennsted S, Talbot L, Moris J, Lipsitz L. Cognitive function in normal-weight, overweight, and obese older adults: an analysis of the advanced cognitive training for the independent and vital elderly cohort. *J Amer Geriatr Society*. 2006; 54: 97-103.
- Kutzing MK, Firestein BL. Altered uric levels and disease states. *J Pharmacol. Exp. Ther*. 2008 Jun; 324(1):1-7.
- Kuvibidila S. Iron deficiency, cell mediated immunity and resistance against infections- present knowledge and controversies. *Nutr Res* 1987; 7: 989.

## L

- Langemann H, Kabiersch A, Newcombe J. Measurement of low-molecular-weight antioxidants, uric acid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol*. 1992;32(5):248-52.
- Langer-Gould A, Huang S, Van Den Eeden SK, Gupta R, Leimpeter AD, Albers KB, Horst R, Hollis B, Steinman L, Nelson LM. Vitamin D, pregnancy, breastfeeding, and postpartum multiple sclerosis relapses. *Arch Neurol*. 2011 Mar;68(3):310-3.
- Lari P, Abnous K, Imenshahidi M, Rashedinia M, Razavi M, Hosseinzadeh H. Evaluation of diazinon-induced hepatotoxicity and protective effects of crocin. *Toxicol Ind Health*. 2015 Apr;31(4):367-76.
- Lassmann. 2003 Lassmann H. Hypoxia-like tissue injury as a component of multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci*. 2003 Feb 15;206(2):187-91.
- Lauer K. Environmental risk factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2010 Mar;10(3):421-40.
- Lautenschläger M, Sendker J, Hüwel S, Galla HJ, Brandt S, Düfer M, Riehemann K, Hensel A. Intestinal formation of trans-crocetin from saffron extract (*Crocus sativus* L.) and in vitro permeation through intestinal and blood brain barrier. *Phytomedicine*. 2015 Jan 15;22(1):36-44.
- Leavitt VM, Buyukturkoglu K, Inglese M, Sumowski JF. Protective personality traits: High openness and low neuroticism linked to better memory in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017 Nov;23(13):1786-1790.
- Leong EM, Semple SJ, Angley M, Siebert W, Petkov J, McKinnon RA. Complementary and alternative medicines and dietary interventions in multiple sclerosis: what is being used in South Australia and why? *Complement Ther Med*. 2009 Aug;17(4):216-23.
- Li, C.Y.; Huang, W.F.; Wang, Q.L.; Cai, F.W.; Hu, B.; Du, J.C.; Wang, J.; Chen, R.; Cai, X.J.; Feng, J.; et al. Crocetin induces cytotoxicity in colon cancer cells via p53-independent mechanisms. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2012, 13, 3757–3761.

- Lincoln NB, das Nair R, Bradshaw L, Constantinescu CS, Drummond AE, Erven A, Evans AL, Fitzsimmons D, Montgomery AA, Morgan M. Cognitive Rehabilitation for Attention and Memory in people with Multiple Sclerosis: study protocol for a randomised controlled trial (CRAMMS). *Trials*. 2015 Dec 8;16:556.
- Licón CC, Carmona M, Llorens S, Berruga MI, Alonso GL. Potential healthy effects of saffron spice (*Crocus sativus* L. stigmas) consumption. *Functional Plant Science and Biotechnology* 4. 2010; Special Issue 2: 64-73.
- Linardaki Z.I., M.G. Orkoula, A.G. Kokkosis, F.N. Lamari, M. Margarity, Investigation of the neuroprotective action of saffron (*Crocus sativus* L.) in aluminum-exposed adult mice through behavioral and neurobiochemical assessment, *Food Chem. Toxicol.* 2013;52:163–170.
- Lintern TC, Beaumont JG, Kenealy PM, Murrell RC. Quality of life (QoL) in severely disabled multiple sclerosis patients: Comparison of three QoL measures using multidimensional scaling. *Qual. Life Res.* 2001; 10(4): 371-378.
- Lips P, van Schoor NM. Quality of life in patients with osteoporosis. *Osteopors Int.* 2005 May;16(5):447-55.
- Liu S, Liu X, Chen S, Xiao Y, Zhuang W. Oral versus intravenous methylprednisolone for the treatment of multiple sclerosis relapses: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One.* 2017; Nov 27;12(11):e0188644. doi: 10.1371/journal.pone.0188644.
- Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. 2ª edición Champaign, Illinois, EEUU: Human Kinetics Books; 1991.
- Lozano J, Matatagui D, Santos JP, Horrillo C. Electronic sensory systems for characterization of bioactive compounds. *Frontiers in Bioactive Compounds* (Vol. 1), ed. Apetrei C., editor. (Sharjah: Bentham Science Publishers;2016; 190–217.
- Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 1996 Apr;46(4):907-11.
- Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol.* 2014;72 Suppl 1:1-5. doi: 10.1159/000367614.
- Løken-Amsrud K.I., Myhr K.-M., Bakke S.J. Alpha-tocopherol and MRI outcomes in multiple sclerosis—association and prediction. *PLoS One.* 2013;8.

## M

- Mahoney FI, Wood OH, Barthel DW. Rehabilitation of chronically ill patients: the influence of complications on the final goal. *South Med J.* 1958 May;51(5):605-9.
- Mahoney FI, Barthel DW. Functional evaluation: the Barthel Index. *Md Med J* 1965; 14: 56-61
- Malfitano, 2014
- Mansoori P, Akhondzadeh S, Raisi F, Ghaeli P, Jamshidi AH, Nasehi AA, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety of the adjunctive saffron on sexual dysfunction induced by a selective serotonin reuptake inhibitor. *J Med Plants.* 2011;10:121–30.

- Marangoni D, Falsini B, Piccardi M, Ambrosio L, Minnella AM, Savastano MC, Bisti S, Maccarone R, Fadda A, Mello E, Concolino P, Capoluongo E. Functional effect of Saffron supplementation and risk genotypes in early age-related macular degeneration: a preliminary report. *J Transl Med.* 2013 Sep 25;11:228.
- Marck CH, De Livera AM, Brown CR, Neate SL, Taylor KL, Weiland TJ, Hadgkiss EJ, Jelinek GA. Health outcomes and adherence to a healthy lifestyle after a multimodal intervention in people with multiple sclerosis: Three year follow-up. *PLoS One.* 2018 May 23;13(5):e0197759. doi: 10.1371/journal.pone.0197759.
- Marriott JJ, Miyasaki JM, Gronseth G, O'Connor PW; Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. Evidence Report: The efficacy and safety of mitoxantrone (Novantrone) in the treatment of multiple sclerosis: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 2010 May 4;74(18):1463-70.
- Martín Moreno V, Gómez Gandoy JB, Antoranz González MJ. Measurement of body fat with bioelectric impedance, skinfold thickness, and equations based on anthropometric measurements. Comparative analysis. *Rev. Esp. Salud Pública.* 2001; May-Jun;75(3):221-36.
- Martín-Moreno JM, Gorgojo L. [Assessment of dietary intake at the population level through individual questionnaires: methodological shadows and lights]. *Rev Esp Salud Publica.* 2007 Sep-Oct;81(5):507-18.
- Martínez JA, Portillo M. Fundamentos de nutrición y dietética. Bases metodológicas y aplicaciones. España: Editorial Medica Panamericana. 2010.
- Martinez L, Neshatian L, Khavari R. Neurogenic Bowel Dysfunction in Patients with Neurogenic Bladder. *Curr Bladder Dysfunct Rep.* 2016 Dec;11(4):334-340.
- Martinez-Martin P, Jeukens-Visser M, Lyons KE, Rodriguez-Blazquez C, Selai C, Siderowf A, Welsh M, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Stebbins GT, Goetz CG, Schrag A. Health-related quality-of-life scales in Parkinson's disease: critique and recommendations. *Mov Disord.* 2011 Nov;26(13):2371-80.
- Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human diseases. *Biochemic.* 1995;77(3):147-61.
- Mashmoul M, Azlan A, Khaza'ai H, Yusof BN, Noor SM. Saffron: A Natural Potent Antioxidant as a Promising Anti-Obesity Drug. *Antioxidants (Basel)* 2013; 2(4):293-308.
- Massa J, O'Reilly EJ, Munger KL, Ascherio A. Caffeine and alcohol intakes have no association with risk of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013 Jan;19(1):53-8.
- Masullo L, Papas MA, Cotugna N, Baker S, Mahoney L, Trabulsi J. Complementary and alternative medicine use and nutrient intake among individuals with multiple sclerosis in the United States. *J Community Health.* 2015 Feb;40(1):153-60.
- Matias-Guiu JA, Cortés-Martínez A, Valles-Salgado M, Oreja-Guevara C, Pytel V, Montero P, Moreno-Ramos T, Matias-Guiu J. Functional Components of Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis: A Cross-Sectional Investigation. *Front Neurol.* 2017 Nov 28;8:643.
- Mauriz E, Laliena A, Vallejo D, Tuñón MJ, Rodríguez-López JM, Rodríguez-Pérez R, García-Fernández MC. Effects of a low-fat diet with antioxidant supplementation on biochemical markers of multiple sclerosis long-term care residents. *Nutr Hosp.* 2013 Nov 1;28(6):2229-35.

- Mazdeh M, Seifirad S, Kazemi N, Seifrabie MA, Dehghan A, Abbasi H. Comparison of vitamin D3 serum levels in new diagnosed patients with multiple sclerosis versus their healthy relatives. *Acta Med Iran*. 2013 May 30;51(5):289-92.
- Mazza, G. *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*; Technomic Publishing Co.: Lancaster, PA,USA, 1998.
- Meyers AR, Gage H, Hendricks A. Health-related quality of life in neurology. *Arch Neurol*. 2000; 57:1224-1227.
- McDowell TY, Amr S, Culpepper WJ, Langenberg P, Royal W, Bever C, Bradham DD. Sun exposure, vitamin D and age at disease onset in relapsing multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*. 2011;36(1):39-45.
- Midgard R, Riise T, Nyland H. Impairment, disability, and handicap in multiple sclerosis. A cross-sectional study in an incident cohort in Møre and Romsdal County, Norway. *J Neurol*. 1996 Apr;243(4):337-44.
- Miletta M, Bogliatto F, Bacchio L. Multidisciplinary Management of Sexual Dysfunction, Perineal Pain, and Elimination Dysfunction in a Woman with Multiple Sclerosis. *Int J MS Care*. 2017 Jan-Feb;19(1):25-28.
- Miller TL, Willett SL, Moss ME, Miller J, Belinka BA Jr. Binding of crocetin to plasma albumin. *J Pharm Sci* . 1982;71(2):173-177.
- Miller E, Wachowicz B, Majsterek I. Advances in antioxidative therapy of multiple sclerosis. *Curr Med Chem*. 2013;20(37):4720-30.
- Minden SL, Orav J, Reich P. Depression in multiple sclerosis. *Gen Hosp Psychiatry*. 1987 Nov;9(6):426-34.
- Mirzaei F, Michels KB, Munger K, O'Reilly E, Chitnis T, Forman MR, Giovannucci E, Rosner B, Ascherio A. Gestational vitamin D and the risk of multiple sclerosis in offspring. *Ann Neurol*. 2011 Jul;70(1):30-40.
- Mohammad-Shirazi M, Taleban FA, Ghafarpour M. Macronutrients intake in Iranian multiple sclerosis patients. *J Med Sci*. 2007; 7:422-6.
- Moccia M, Lanzillo R, Palladino R, Russo C, Carotenuto A, Massarelli M, Vacca G, Vacchiano V, Nardone A, Triassi M, Morra VB. Uric acid: a potential biomarker of multiple sclerosis and of its disability. *Clin Chem Lab Med*. 2015a Apr;53(5):753-9.
- Moccia M, Lanzillo R, Costabile T, Russo C, Carotenuto A, Sasso G, Postiglione E, De Luca Picione C, Vastola M, Maniscalco GT, Palladino R, Brescia Morra V. Uric acid in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 2-year longitudinal study. *J Neurol*. 2015b;262(4):961-7.
- Modabbernia A, Sohrabi H, Nasehi AA, Raisi F, Saroukhani S, Jamshidi A, Tabrizi M, Ashrafi M, Akhondzadeh S. Effect of saffron on fluoxetine-induced sexual impairment in men: randomized double-blind placebo-controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 Oct;223(4):381-8.
- Modaghegh MH, Shahabian M, Esmaili HA, Rajbai O, Hosseinzadeh H. Safety evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) tablets in healthy volunteers. *Phytomedicine*. 2008;15(12):1032-1037.
- Modaghegh MH, Roudsari B, Hafezi S. Digital pressure and oxygen saturation measurements in the diagnosis of chronic hemodialysis access-induced distal ischemia. 2015 Jul;62(1):135-42.

- Modrego PJ, Pina MA, Simón A, Azuara MC. The interrelations between disability and quality of life in patients with multiple sclerosis in the area of Bajo Aragón, Spain: a geographically based survey. *Neurorehabil Neural Repair*. 2001;15(1):69-73.
- Moghaddasi M, Mamarabadi M, Mohebi N, Razjouyan H, Aghaei M. Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in Iranian patients with Multiple Sclerosis: a case control study. *Clin Neurol Neurosurg*. 2013 Sep;115(9):1802-5.
- Mohamadpour AH, Ayati Z, Parizadeh MR, Rajbai O, Hosseinzadeh H. Safety Evaluation of Crocin (a constituent of saffron) Tablets in Healthy Volunteers. *Iran J Basic Med Sci*. 2013 Jan;16(1):39-46.
- Mohammad-Shirazi M, Taleban, FA, Ghafarpoor, M. Macronutrients intake in Iranian multiple sclerosis patients. *J. Med. Sci*. 2007; 7 (3): 422-426.
- Mojabi A, Eidi M, Kamalinejad et al. Study of the effects of intra-nucleus accumbens shell injections of alcoholic extract of *Crocus sativus* on the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in rats. *Physiology and Pharmacology*. 2008;12(2):121–128.
- Mokry LE, Ross S, Timpson NJ, Sawcer S, Davey Smith G, Richards JB. Obesity and Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *PloS Med*. 2016;13(6):e1002053. Doi: 10.1371/journal.pmed.1002053.
- Monji A, Takita M, Samejima T, Takaishi T, Hashimoto K, Matsunaga H, Oda M, Sumida Y, Mizoguchi Y, Kato T, Horikawa H, Kanba S. Effect of yokukansan on the behavioral and psychological symptoms of dementia in elderly patients with Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Mar 17;33(2):308-11.
- Moreiras O, Carbajal, L Cabrera, C Cuadrado. Tablas de composición de alimentos. Guía de prácticas. Ediciones Pirámide (Grupo Anaya, SA). 18ª edición revisada y ampliada. 2016.
- Moshiri M, Vahabzadeh M, Hosseinzadeh H. Clinical Applications of Saffron (*Crocus sativus*) and its Constituents: A Review. *Drug Res (Stuttg)*. 2015 Jun;65(6):287-95.
- Mostert JP, Ramsaransing GS, Heersema DJ, Heerings M, Wilczak N, De Keyser J. Serum uric acid levels and leukocyte nitric oxide production in multiple sclerosis patients outside relapses. *J Neurol Sci*. 2005 Apr 15;231(1-2):41-4.
- Moure A, Franco D, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Lema JM. Evaluation of extracts from Gevuina avellana hulls as antioxidants. *J Agric Food Chem*. 2000 Sep;48(9):3890-7.
- Mousavi SH, Tayarani NZ, Parsaee H. Protective effect of saffron extract and crocin on reactive oxygen species-mediated high glucose-induced toxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2010 Mar;30(2):185-91.
- Muñoz-Lasa S, Ferriero G, Valero R, Gomez-Muñiz F, Rabini A, Varela E. Effect of therapeutic horseback riding on balance and gait of people with multiple sclerosis. *G Ital Med Lav Ergon*. 2011 Oct-Dec;33(4):462-7.
- Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006 Dec 20;296(23):2832-8.
- Munger KL, Chitnis T, Frazier AL, Giovannucci E, Spiegelman D, Ascherio A. Dietary intake of vitamin D during adolescence and risk of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2011 Mar;258(3):479-85.

- Murrell R. Quality of life and neurological illness: a review of the literature. *Neuropsychol Rev.* 1999 Dec;9(4):209-29.
- Mähler A, Steiniger J, Bock M, Brandt AU, Haas V, Boschmann M, Paul F. Is metabolic flexibility altered in multiple sclerosis patients? *PLoS One.* 2012;7(8):e43675. doi: 10.1371/journal.pone.0043675.
- Mähler A, Steiniger J, Bock M, Klug L, Parreidt N, Lorenz M, Zimmermann BF, Krannich A, Paul F, Boschmann M. Metabolic response to epigallocatechin-3-gallate in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2015 Mar;101(3):487-95.
- Mäurer y col., 2016 Mäurer M. Rehabilitation in multiple sclerosis: the role of tele-rehabilitation/gaming. *Neurodegener Dis Manag.* 2016 Dec;6(6s):17-18.
- N**
- Nam KN, Park YM, Jung HJ, Lee JY, Min BD, Park SU, Jung WS, Cho KH, Park JH, Kang I, Hong JW, Lee EH. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. *Eur J Pharmacol.* 2010 Dec 1;648(1-3):110-6.
- Nakamura y col., 2017 Nakamura Y, Nakajima H, Hosokawa T, Yamane K, Ishida S, Kimura F. Acute Cerebellar Ataxia Associated with Anti-glutamic Acid Decarboxylase Antibodies Mimicking Miller Fisher Syndrome. *Intern Med.* 2018 Jan 15;57(2):269-271.
- Naghbi SM, Hosseini M, Khani F, Rahimi M, Vafae F, Rakhshandeh H, Aghaie A. Effect of Aqueous Extract of *Crocus sativus* L. on Morphine-Induced Memory Impairment. *Adv Pharmacol Sci.* 2012;2012:494367. doi: 10.1155/2012/494367.
- Najafi MR, Shaygannajad V, Mirpourian M, Gholamrezaei A. Vitamin B(12) Deficiency and Multiple Sclerosis; Is there Any Association? *Int J Prev Med.* 2012 Apr;3(4):286-9.
- Nemati, 2008 Nemati H, Boskabady MH, Ahmadzadeh Vostakolaei H. Stimulatory effect of *Crocus sativus* (saffron) on beta2-adrenoceptors of guinea pig tracheal chains. *Phytomedicine.* 2008 Dec;15(12):1038-45.
- Neuhaus y col., 2018 Neuhaus M, Calabrese P, Annoni JM. Decision-Making in Multiple Sclerosis Patients: A Systematic Review. *Mult Scler Int.* 2018 Mar 12;2018:7835952. doi:10.1155/2018/7835952.
- Noorbala AA, Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Jamshidi AH. Hydro-alcoholic extract of *Crocus sativus* L versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. *J Ethnopharmacol.* 2005;97(2):281-4.
- Nortvedt MW, Riise T, Myht KM, Nyland HI. Quality of life in multiple sclerosis: measuring the disease effects more broadly. *Neurology* 1999; 53: 1098-1103.
- Nortvedt MW, Riise T. The use of quality of life measures in multiple sclerosis research. *Mult Scler.* 2003 Feb;9(1):63-72.
- Nortvedt MW, Riise T, Maeland JG. Multiple sclerosis and lifestyle factors: the Hordaland Health Study. *Neurol Sci.* 2005 Dec;26(5):334-9.

## O

- O'Connor P, Lee L, Tin Ng P, Narayana P, Wolinsky JS. Determinants of overall quality of life in secondary progressive MS: a longitudinal study. *Neurology* 2001; 57: 889-891

- Olarazan J, Cruz I, benito-León J, Morales JM, Duque P, Rivera-Navarro J. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: methods and prevalence from the GEDMA Study. *Eur. Neurol.* 2009, 61(2): 87-93.
- Olde Rikkert MG, Verhey FR, Sijben JW, Bouwman FH, Dautzenberg PL, Lansink M, Sipers WM, van Asselt DZ, van Hees AM, Stevens M, Vellas B, Scheltens P. Differences in nutritional status between very mild Alzheimer's disease patients and healthy controls. *J Alzheimers Dis.* 2014;41(1):261-71.
- Olmedilla B, Granada F. Carotenoids and retinol-equivalents in food composition tables from European countries (EPIC study). *Eur J Clin Nutr.* 2000 Mar;54(3):268-9.
- Ottonello M, Pellicciari L, Centonze D, Foti C, Pistarini C, Albeni C, Giordano A. The cross-cultural adaptation and psychometric validation of the MSSS-88 for use in Italian patients with multiple sclerosis. *Disabil Rehabil.* 2017 Oct 25:1-7.
- Ozakbas S, Akdede BB, Kösehasanogullari G, Aksan O, Idiman E. Difference between generic and multiple sclerosis-specific quality of life instruments regarding the assessment of treatment efficacy. *J Neurol Sci.* 2007 May 15;256(1-2):30-4.

## P

- Pacheco M, Guerrero M, Fernández O. La disfunción genitourinaria en la esclerosis múltiple. *Rev Neurol* 2011; 17: 17-27.
- Pakdaman H, Amini Harandi A, Gharagozli K, Abbasi M, Ashrafi F, Ghaffarpor M, Sharifi S, Delavar Kasmae H, Assarzagagan F, Arabahmadi M, Behnam B, *Int j Neurosci.* 2017 Jun; 127(6): 501-507.
- Pakpoor J, Seminog OO, Ramagopalan SV, Goldacre MJ. Clinical associations between gout and multiple sclerosis, Parkinson's disease and motor neuron disease: record-linkage studies. *BMC Neurol.* 2015 Feb 28;15:16.
- Pantzaris MC, Loukaidis GN, Ntzani EE, Patrikios IS. A novel oral nutraceutical formula of omega-3 and omega-6 fatty acids with vitamins (PLP10) in relapsing remitting multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled proof-of-concept clinical trial. *BMJ Open.* 2013 Apr 17;3(4).
- Parker RS. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.* 1996 Apr;10(5):542-51.
- Pasquinelli S, Solaro C. Nutritional assessment and malnutrition in multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2008 Dec;29 Suppl 4:S367-9.
- Pavsic K, Pelicon K, Ledinek AH, Segal S. Short-term impact of fampridine on motor and cognitive functions, mood and quality of life among multiple sclerosis patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2015 Dec;139:35-40.
- Pfander H, Wittwer F. Carotenoid glycosides. Part 2. Studies on the carotenoid composition of saffron. *Helv. Chim. Acta.* 1975; 58: 1608-1620.
- Pfander H, Schurtenberger H. Biosynthesis of C20-carotenoids in *Crocus sativus* L. *Phytochem.* 1982; 21(5):1039-1042.
- Pfennings L, Cohen L, Miller D, Gerbaud L, Vleugels L, Freeman J, Vernay D, Biolay S, Ketelaer P, Thompson A, Polman C, van der Ploeg H. Using the short form-36 with multiple sclerosis patients in five countries: a cross-cultural comparison. *Psychological Reports* 1999; 85: 19-31.

- Payne A. Nutrition and diet in the clinical management of multiple sclerosis. *J Hum Nutr Diet* 2011; 14: 349-357.
- Pellegrini N, Serafini M, Salvatore S, Del Rio D, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Mol Nutr Food Res*. 2006 Nov;50(11):1030-8.
- Penesova A, Vlcek M, Imrich R, Vernerova L, Marko A, Meskova M, Grunnerova L, Turcani P, Jezova D, Kollar B. Hyperinsulinemia in newly diagnosed patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis*. 2015 Aug;30(4):895-901.
- Peña-Altamira E, Petralla S, Massenzio F, Virgili M, Bolognesi ML, Monti B. Nutritional and Pharmacological Strategies to Regulate Microglial Polarization in Cognitive Aging and Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2017 Jun 7;9:175.
- Petajan JH, Gapmaier E, White AT, Spencer MK, Mino L, Hicks RW. Impact of aerobic training on fitness and quality of life in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 1996; 39: 432-441.
- Piccardi M, Marangoni D, Minnella AM, Savastano MC, Valentini P, Ambrosio L, Capoluongo E, Maccarone R, Bisti S, Falsini B. A longitudinal follow-up study of saffron supplementation in early age-related macular degeneration: sustained benefits to central retinal function. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:429124. doi: 10.1155/2012/429124.
- Pilutti LA, Dlugonski D, Pula JH, Motl RW. Weight status in persons with multiple sclerosis: Implications for mobility outcomes. *J Obes*. 2012; 2012:868256.
- Pinhas-Hamiel O, Livne M, Harari G, Achiron A. Prevalence of overweight, obesity and metabolic syndrome components in multiple sclerosis patients with significant disability. *Eur J Neurol*. 2015 Sep;22(9):1275-9.
- Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW; AFFIRM Investigators. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006 Mar 2;354(9):899-910.
- Pompa A, Morone G, Iosa M, Pace L, Catani S, Casillo P, Clemenzi A, Troisi E, Tonini A, Paolucci S, Grasso MG. Does robot-assisted gait training improve ambulation in highly disabled multiple sclerosis people? A pilot randomized control trial. *Mult Scler*. 2017 Apr;23(5):696-703.
- Posner BM, Jette AM, Smith KW, Miller DR. Nutrition and health risks in the elderly: the nutrition screening initiative. *Am J Public Health*. 1993 Jul;83(7):972-8.
- Pitsikas N, Zisopoulou S, Tarantilis PA, Kanakis CD, Polissiou MG, Sakellaridis N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins on recognition and spatial rats' memory. *Behav Brain Res*. 2007 Nov 2;183(2):141-6.
- Pitsikas N, Tarantilis PA. Crocins, the active constituents of *Crocus sativus* L., counteracted apomorphine-induced performance deficits in the novel object recognition task, but not novel object location task, in rats. *Neurosci Lett*. 2017 Mar 22;644:37-42
- Ploughman M. A new era of multiple sclerosis rehabilitation: lessons from stroke. *Lancet Neurol*. 2017 Oct;16(10):768-769.
- Plow M, Finlayson M, Cho C. Correlates of nutritional behavior in individuals with multiple sclerosis. *Disabil Health J*. 2012 Oct;5(4):284-91.

- Plow M, Finlayson M. A qualitative study of nutritional behaviors in adults with multiple sclerosis. *J of Neuros Nursing* 2014; 44: 6.
- Porras-Betancourt M, Núñez-Orozco L, Plascencia-Álvarez NI, Quiñones-Aguilar S, Sauri-Suárez S. Esclerosis múltiple. *Rev Mex Neuroci.* 2007;8(1):57- 66.
- Prieto JM, Yuste JR. *La clínica y el laboratorio.* 22ª edición. 2015. Elsevier Masson.
- Prisnie JC, Sajobi TT, Wang M, Patten SB, Fiest KM, Bulloch AGM, Pringsheim T, Wiebe S, Jette N. Effects of depression and anxiety on quality of life on five common neurological disorders. *General Hospital Psychiatry.* 2018; 52: 58-63.
- Prosperini L1, Kouleridou A, Petsas N, Leonardi L, Tona F, Pantano P, Pozzilli C. The relationship between infratentorial lesions, balance deficit and accidental falls in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2011 May 15;304(1-2):55-60.
- Prosiegel M, Schelling A, Wagner-Sonntag E. Dysphagia and multiple sclerosis. *Int Ms J.* 2004;11(1):22–31.
- Provinciali L, Ceravolo MG, Bartolini M, Logullo F, Danni M. A multidimensional assessment of multiple sclerosis: relationships between disability domains. *Acta Neurol Scand.* 1999 Sep;100(3):156-62.
- Purushothuman S, Nandasena C, Peoples CL, El Massri N, Johnstone DM, Mitrofanis J, Stone J. Saffron pre-treatment offers neuroprotection to Nigral and retinal dopaminergic cells of MPTP-Treated mice. *J Parkinsons Dis.* 2013;3(1):77-83.

## R

- Ramsaransing GS, Heersema DJ, De Keyser J. Serum uric acid, dehydroepiandrosterone sulphate, and apolipoprotein E genotype in benign vs. progressive multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2005 Jul;12(7):514-8.
- Ramsaransing GS, Mellema SA, De Keyser J. Dietary patterns in clinical subtypes of multiple sclerosis: an exploratory study. *Nutr J.* 2009 Aug 10;8:36.
- Rao SM, Leo GJ, Ellington L, Nauertz T, Bernardin L, Unverzagt F. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. II. Impact on employment and social functioning. *Neurology.* 1991 May;41(5):692-6.
- Razak SIA, Anwar Hamzah MS, Yee FC, Kadir MRA, Nayan NHM. A Review on Medicinal Properties of Saffron toward Major Diseases. *J Herbs Spices Med. Plants.* 2017; 23: 98–116.
- Rezapour-Firouzi S, Arefhosseini SR, Ebrahimi-Mamaghani M, Farhoudi M, Baradaran B, Ali TM, Zamani F. Erythrocyte membrane fatty acids in multiple sclerosis patients and hot-nature dietary intervention with co-supplemented hemp-seed and evening-primrose oils. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2013 Oct 3;10(6):519-27.
- Riccio P, Rossano R, Liuzzi GM. May diet and dietary supplements improve the wellness of multiple sclerosis patients? A molecular approach. *Autoimmune Dis.* 2011 Feb 24;2010:249842. doi: 10.4061/2010/249842.
- Riccio P, Rossano R. The role of nutrition in multiple sclerosis: A story yet to be written. *Revista Española de esclerosis múltiple* 2013;5(25):24-37.
- Riccio P, Rossano R. Nutrition facts in multiple sclerosis. *ASN Neuro.* 2015;7:1-20.
- Riccio P, Rossano R, Larocca M, Trotta V, Mennella I, Vitaglione P, Ettorre M, Graverini A, De Santis A, Di Monte E, Coniglio MG. Anti-inflammatory nutritional intervention in patients with relapsing-remitting and primary-progressive

- multiple sclerosis: A pilot study. *Exp Biol Med* (Maywood). 2016 Mar;241(6):620-35.
- Ríos JL, Recio MC, Giner RM, Máñez S. An Update Review of Saffron and its Active Constituents. *Phytother Res*. 1996;10(3):189–93.
- Rodgers MM, Mucare JA, King DL, Mathews T, Gupta SC, Glaser RM. Month aerobic training program: *Journal of Rehabilitation Research and Development*. 1999;3:183-88.
- Rosato R, Testa S, Oggero A, Molinengo G, Bertolotto A. Quality of life and patient preferences: identification of subgroups of multiple sclerosis patients. *Qual Life Res*. 2015;24(9):2173-82.
- Rothwell PM, McDowell Z, Wong CK, Dorman PJ. Doctors and patients don't agree: cross sectional study of patients' and doctors' perceptions and assessments of disability in multiple sclerosis. *BMJ* (1997) 314(7094):1580–3.
- Rudick R, Antel J, Confavreux C, Cutter G, Ellison G, Fischer J, Lublin F, Miller A, Petkau J, Rao S, Reingold S, Syndulko K, Thompson A, Wallenberg J, Weinschenker B, Willoughby E. Clinical outcomes assessment in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1996 Sep;40(3):469-79.
- Russo M, Dattola V, De Cola MC, Logiudice AL, Porcari B, Cannavò A, Sciarrone F, De Luca R, Molonia F, Sessa E, Bramanti P, Calabrò RS. The role of robotic gait training coupled with virtual reality in boosting the rehabilitative outcomes in patients with multiple sclerosis. *Int J Rehabil Res*. 2018 Jun;41(2):166-172.

## S

- Saboor-Yaraghi AA, Harirchian MH, Mohammadzadeh Honarvar N, Bitarafan S, Abdolahi M, Siassi F, Salehi E, Sahraian MA, Eshraghian MR, Roostaei T, Koohdani F. The Effect of Vitamin A Supplementation on FoxP3 and TGF- $\beta$  Gene Expression in Avonex-Treated Multiple Sclerosis Patients. *J Mol Neurosci*. 2015 Jul;56(3):608-12.
- Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. A prospective double-blind randomized placebo-controlled study of the effect of saffron (*Crocus sativus* Linn.) on semen parameters and seminal plasma antioxidant capacity in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Phytother Res*. 2011 Apr;25(4):508-16.
- Saka M, Saka M, Koseler E, Metin S, Bilen S, Aslanyavrusu M, Ak F, Kiziltan G. Nutritional status and anthropometric measurements of patients with multiple sclerosis. *Saudi Med J*. 2012 Feb;33(2):160-6.
- Salemi G, Gueli MC, Vitale F, Battaglieri F, Guglielmini E, Ragonese P, Trentacosti A, Massenti MF, Savettieri G, Bono A. Blood lipids, homocysteine, stress factors, and vitamins in clinically stable multiple sclerosis patients. *Lipids Health Dis*. 2010 Feb 18;9:19.
- Salvá Casanovas A. Valoración del estado nutricional en las personas mayores. En: Serrano Ríos M (ed.), Cervera Ral P, López Nomdedeu C, Ribera Casado JM, Sastre Gallego A (dirs). *Guía de alimentación para personas mayores*. Madrid: Ergon; 2010. p. 41-58.
- Salhofer-Polanyi S, Windt J, Sumper H, Grill H, Essmeister M, Diermayr G, Zebenholzer K, Leutmezer F, Zulehner G, Vass K, Asenbaum-Nan S. Benefits of

- inpatient multidisciplinary rehabilitation in multiple sclerosis. *Neurorehabil* 2013; 33(2): 285-292.
- Sampathu SR, Shivashankar S, Lewis YS. Saffron (*Crocus sativus* Linn.). Cultivation, processing, chemistry and standardization. *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 1984; 20(2):123-57.
- Samarghandian S, Tavakkol Afshari J, Davoodi S. Suppression of pulmonary tumor promotion and induction of apoptosis by *Crocus sativus* L. extraction. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011 May;164(2):238-47.
- Samarghandian S, Borji A, Farahmand SK, Afshari R, Davoodi S. *Crocus sativus* L. (saffron) stigma aqueous extract induces apoptosis in alveolar human lung cancer cells through caspase-dependent pathways activation. *Biomed Res Int.* 2013;2013:417928.
- Samarghandian S, Borji A. Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients. *Pharmacognosy Res.* 2014a Apr; 6(2):99-107.
- Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Samini F. Ameliorative effect of saffron aqueous extract on hyperglycemia, hyperlipidemia, and oxidative stress on diabetic encephalopathy in streptozotocin induced experimental diabetes mellitus. *Biomed Res Int.* 2014b;2014:920857. doi: 10.1155/2014/920857.
- Sánchez AM, Carmona M, Ordoudi SA, Tsimidou MZ, Alonso GL. Kinetics of individual crocetin ester degradation in aqueous extracts of saffron (*Crocus sativus* L.) upon thermal treatment in the dark. *J Agric Food Chem.* 2008a Mar 12;56(5):1627-37.
- Sánchez AM, Carmona M, Zalacain A, Carot JM, Jabaloyes JM, Alonso GL. Rapid determination of crocetin esters and picrocrocetin from saffron spice (*Crocus sativus* L.) using UV-visible spectrophotometry for quality control. *J Agric Food Chem.* 2008b May 14; 56(9):3167-75.
- Sánchez AM, Carmona M, Jarén-Galán M, Mosquera MI, Alonso GL. Picrocrocetin kinetics in aqueous saffron spice extracts (*Crocus sativus* L.) upon thermal treatment. *J Agric Food Chem.* 2011 Jan 12; 59(1):249-55.
- Sánchez-Seco VG, Casanova Peño I, Arroyo González R. [Monoclonal antibodies for the treatment of multiple sclerosis]. *Med Clin (Barc).* 2014 Dec;143 Suppl 3:30-4.
- Saura-Calixto F, García-Alonso A, Goñi I, Bravo L. In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *J Agric. Food Chem.* 2000; 48: 3342-3347.
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet *Food Chemistry* 101 (2007) 492–501
- Scannevin RH, Chollate S, Jung MY, Shackett M, Patel H, Bista P, Zeng W, Ryan S, Yamamoto M, Lukashev M, Rhodes KJ. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012 Apr;341(1):274-84.
- Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr.* 2007; 157(13-14):315-319
- Schwarz S, Knorr C, Geiger H, Flachenecker P. Complementary and alternative medicine for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008 Sep;14(8):1113-9.

- Serrano-Díaz J, Sánchez AM, Maggi L, Carmona M, Alonso GL. Synergic effect of water-soluble components on the coloring strength of saffron spice. *J Food Compost Anal.* 2011 Sept; 24(6): 873-879.
- Serrano-Díaz J., Sánchez AM, Maggi L, Martínez-Tomé M, García-Diz L., Murcia MA, Alonso GL. Increasing the applications of *Crocus sativus* flowers as natural antioxidants. *J. Food Sci.* 2012 Nov; 77: C1162-C1168.
- Serrano-Díaz J, Sánchez AM, Martínez-Tomé M, Winterhalter P, Alonso, GL. A contribution to nutritional studies on *Crocus sativus* flowers and their value as food. *J. Food Compos. Anal.* 2013; 31: 101–108.
- Seyde WC, McKernan DJ, Laudeman T, Gainer JL, Longnecker DE. Carotenoid compound crocetin improves cerebral oxygenation in hemorrhaged rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1986 Dec;6(6):703-7.
- Sfagos C, Makis AC, Chaidos A, Hatzimichael EC, Dalamaga A, Kosma K, Bourantas KL. Serum ferritin, transferrin and soluble transferrin receptor levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2005 Jun;11(3):272-5.
- Shah S, Vanclay F, Cooper B. Improving the sensitivity of the Barthel Index for stroke rehabilitation. *J Clin Epidemiol.* 1989; 42:703-709.
- Shahmansouri N, Farokhnia M, Abbasi SH, Kassaian SE, Noorbala Tafti AA, Gougol A, Yekehtaz H, Forghani S, Mahmoodian M, Saroukhani S, Arjmandi-Beglar A, Akhondzadeh S. A randomized, double-blind, clinical trial comparing the efficacy and safety of *Crocus sativus* L. with fluoxetine for improving mild to moderate depression in post percutaneous coronary intervention patients. *J Affect Disord.* 2014 Feb;155:216-22.
- Sheard JM, Ash S, Silburn PA, Kerr GK. Prevalence of malnutrition in Parkinson's disease: a systematic review. *Nutr Rev.* 2011 Sep;69(9):520-32.
- Sheehan JP, Popp B, Monteith S, Toulmin S, Tomlinson J, Martin J, Cifarelli CP, Lee DH, Park DM. Trans sodium crocetinate: functional neuroimaging studies in a hypoxic brain tumor. *J Neurosurg.* 2011 Oct;115(4):749-53.
- Sheng L, Qian Z, Zheng S, Xi L. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: crocin inhibits pancreatic lipase. *Eur J Pharmacol* 2006; 543:116-122.
- Sheng L, Qian Z, Shi Y, Yang L, Xi L, Zhao B, Xu X, Ji H. Crocetin improves the insulin resistance induced by high-fat diet in rats. *Br J Pharmacol.* 2008 Jul;154(5):1016-24.
- Shinto L, Marracci G, Baldauf-Wagner S, Strehlow A, Yadav V, Stuber L, Bourdette D. Omega-3 fatty acid supplementation decreases matrix metalloproteinase-9 production in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009 Feb-Mar;80(2-3):131-6.
- Shirali AS, Bischoff MS, Lin HM, Oyfe I, Lookstein R, Griep RB, Di Luozzo G. Predicting the risk for acute type B aortic dissection in hypertensive patients using anatomic variables. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2013 Mar;6(3):349-57.
- Shorobura MS. Effect of preventive treatment on cognitive performance in patients with multiple sclerosis. *Wiadomosci lekarskie* 2018 Jan; 71(3): 648-652.
- Sioka C, Fotopoulos A, Georgiou A, Papakonstantinou S, Pelidou S-H, Kystsis AP, Kalef-Ezra JA. Body Composition in Ambulatory Patients With Multiple Sclerosis. *J Clin. Densitom.* 2011 Oct; 14(4): 465-470.
- Singer M, Stidwill RP, Nathan A, Gainer JL. Intravenous crocetin prolongs survival in a rat model of lethal hypoxemia. *Crit Care Med.* 2000 Jun;28(6):1968-72.

- Slawta JN, Wilcox AR, McCubbin JA, Nalle DJ, Fox SD, Anderson G. Health behaviors, body composition, and coronary heart disease risk in women with multiple sclerosis. *Arch Phys Med Rehabil*. 2003 Dec;84(12):1823-30.
- Smale KJ, Carr SE, Schwartz AF, Das Nair R, Lincoln NB. An evaluation of treatment integrity in randomised controlled trial of memory rehabilitation for people with multiple sclerosis. *Clin Rehabil* 2015 May; 29(5): 493-499.
- Smolders J, Peelen E, Thewissen M, Cohen Tervaert JW, Menheere P, Hupperts R, Damoiseaux J. Safety and T cell modulating effects of high dose vitamin D3 supplementation in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2010 Dec 13;5(12):e15235.
- Motl RW, McAuley E, Snook EM. Physical activity and multiple sclerosis: A meta-analysis. *Multiple Sclerosis* 2005 Aug; 11(4): 459-463
- Soilu-Hänninen M, Airas L, Mononen I, Heikkilä A, Viljanen M, Hänninen A. 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2005 Jun;11(3):266-71.
- Soilu-Hänninen M, Aivo J, Lindström BM, Elovaara I, Sumelahti ML, Färkkilä M, Tienari P, Atula S, Sarasoja T, Herrala L, Keskinarkaus I, Kruger J, Kallio T, Rocca MA, Filippi M. A randomised, double blind, placebo controlled trial with vitamin D3 as an add on treatment to interferon  $\beta$ -1b in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 May;83(5):565-71
- Soini E, Joutseno J, Sumelahti ML. Cost-utility of First-line Disease-modifying Treatments for Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Clin Ther*. 2017 Mar;39(3):537-557.
- Sorgun MH, Yucesan C, Tegin C. Is malnutrition a problem for multiple sclerosis patients? *J Clin Neurosci*. 2014 Sep;21(9):1603-5.
- Speranza G, Dadá G, Manitto P, Monti D, Gramática P. 13 cis-crocinn: A new crocinoid of saffron. *Gaveta Chim Ital*. 1984; 114: 189-192.
- Srivastava R, Ahmed H, Dixit RK, Dharamveer, Saraf SA. *Crocus sativus* L.: A comprehensive review. *Pharmacogn Rev*. 2010 Jul;4(8):200-8.
- Srivastava RA, Mistry S, Sharma S. A novel anti-inflammatory natural product from *Sphaeranthus indicus* inhibits expression of VCAM1 and ICAM1, and slows atherosclerosis progression independent of lipid changes. *Nutr. Metab. (Lond)* 2015 Jun; 12(20): 1-16
- Steffensen LH, Jørgensen L, Straume B, Mellgren SI, Kampman MT. Can vitamin D supplementation prevent bone loss in persons with MS? A placebo-controlled trial. *J Neurol*. 2011 Sep;258(9):1624-31.
- Sterke CS, Huisman SL, van Beeck EF, Looman CW, van der Cammen TJ. Is the Tinetti Performance Oriented Mobility Assessment (POMA) a feasible and valid predictor of short-term fall risk in nursing home residents with dementia?. *Int Psychogeriatr*. 2010 Mar;22(2):254-63.
- Sternberg Z, Leung C, Sternberg D, Li F, Karmon Y, Chadha K, Levy E. The prevalence of the classical and non-classical cardiovascular risk factors in multiple sclerosis patients. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013 Feb 1;12(1):104-11.
- Stoffel JT. Chronic Urinary Retention in Multiple Sclerosis Patients: Physiology, Systematic Review of Urodynamic Data, and Recommendations for Care. *Urol Clin North Am*. 2017 Aug;44(3):429-439.

- Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, Abe K. The effects of ethanol and crocin on the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Jpn J Pharmacol*. 1995 Apr;67(4):395-7.
- Sujata V, Ravishankar GA, Venkataraman LV. Methods for the analysis of saffron metabolites crocin, crocetin, picrocrocin and safranal for the determination of the quality of the spice using thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J Chromatogr*. 1992; 624: 497-502.
- Sawcer S, Ban M, Wason J, Dudbridge F. What role for genetics in the prediction of multiple sclerosis? *Ann Neurol*. 2010 Jan;67(1):3-10.
- Swank RL, Dugan BB. Effect of low saturated fat diet in early and late cases of multiple sclerosis. *Lancet* 1990 Jul; 336(8706): 37-39
- Swank RL, Goodwin J. Review of MS patient survival on a Swank low saturated fat diet. *Nutrition* 2003;19(2): 161–162.

## T

- Talaei A, Hassanpour Moghadam M, Sajadi Tabassi SA, Mohajeri SA. Crocin, the main active saffron constituent, as an adjunctive treatment in major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot clinical trial. *J Affect Disord*. 2015 Mar 15;174:51-6.
- Taraghi Z, Ilali E. Quality of life among multiple sclerosis patient. *J Apl. Sci*. 2010; 10(14): 1485-1488.
- Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr A*. 1994 Mar 25;664(1):55-61.
- Tarantilis PA, Tsoupras G, Polissiou M. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1995 May 5;699(1-2):107-118.
- Tavakoli M, Pour Manshadi SM, Naderi N, Dehghan A, Azizi S. Unusual side effects of interferon Beta-1a in patient with multiple sclerosis. *Mater Sociomed*. 2012;24(3):203-5.
- Terré-Boliart R, Orient-López, F. Rehabilitation therapy in multiple sclerosis. *Revista de Neurología* 2007 Apr; 44(7): 426-431
- Tetty P, Van Der Mei IAF. Lipids in multiple sclerosis: Adverse lipid profiles, disability and disease progression. *Clin. Lipidol*. 2014 Nov; 9(5): 473-475.
- Thomas FJ, Wiles CM. Dysphagia and nutritional status in multiple sclerosis. *J Neurol*. 1999 Aug; 246(8): 677-682.
- Tinetti ME, Williams TF, Mayewski R. Fall risk index for elderly patients based on number of chronic disabilities. *Am J Med*. 1986 Mar;80(3):429-34.
- Tinetti ME, Speechley M, Ginger SF. Risk factors for falls among elderly persons living in the community. *N Engl J Med*. 1988; 319(26): 1701-7
- Tiribuzi R, Crispoltoni L, Chiurchiù V, Casella A, Montecchiani C, Del Pino AM, Maccarrone M, Palmerini CA, Caltagirone C, Kawarai T, Orlacchio A, Orlacchio A. Trans-crocetin improves amyloid- $\beta$  degradation in monocytes from Alzheimer's Disease patients. *J Neurol Sci*. 2017 Jan 15;372:408-412.

- Todorich B, Pasquini JM, Garcia CI, Paez PM, Connor JR. Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. *Glia*. 2009 Apr 1;57(5):467-78.
- Toncev G, Milicic B, Toncev S, Samardzic G. Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *Eur. J. Neurol*. 2002; 9(3): 221-226.
- Toghianifar N, Ashtari F, Zarkesh-Esfahani SH, Mansourian M. Effect of high dose vitamin D intake on interleukin-17 levels in multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Neuroimmunol*. 2015 Aug 15;285:125-8.
- Tojo, 2001
- Torun M, Dincer C, Topuz A, Sahin-Nadeem H, Ozdemir F. Aqueous extraction kinetics of soluble solids, phenolics and flavonoids from sage (*Salvia fruticosa* Miller) leaves. *Food Sci Technol*. 2015 May;52(5):2797-805.
- Trave y Mercadé, 2015
- Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: An immune or neurodegenerative disorder? Review. *Annu. Rev. Neurosci*. 2008; 31: 247-269.
- Łabuz-Roszak B, Kubicka-Baczyk K, Pierzchała K, Horyniecki M, Machowska-Majchrzak A, Augustyńska-Mutryn D, Kosałka K, Michalski K, Pyszak D, Wach J. [Quality of life in multiple sclerosis--association with clinical features, fatigue and depressive syndrome]. *Psychiatr Pol*. 2013 May-Jun;47(3):433-42.

## U

- Ulbricht C, Conquer J, Costa D, Hollands W, Iannuzzi C, Isaac R, Jordan JK, Ledesma N, Ostroff C, Serrano JM, Shaffer MD, Varghese M. An evidence-based systematic review of saffron (*Crocus sativus*) by the Natural Standard Research Collaboration. *J Diet Suppl*. 2011 Mar; 8(1):58-114.
- Ulivieri C, Baldari CT. Statins: from cholesterol-lowering drugs to novel immunomodulators for the treatment of Th17-mediated autoimmune diseases. *Pharmacol Res*. 2014 Oct;88:41-52.
- Umigai N, Murakami K, Ulit MV, Antonio LS, Shirotori M, Morikawa H, Nakano T. The pharmacokinetic profile of crocetin in healthy adult human volunteers after a single oral administration. *Phytomedicine*. 2011 May 15;18(7):575-8.

## V

- Van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, Blizzard L, Taylor BV, Kilpatrick T, Butzkueven H, McMichael AJ. Vitamin D levels in people with multiple sclerosis and community controls in Tasmania, Australia. *J Neurol*. 2007 May;254(5):581-90.
- Van Horssen J, Witte ME, Schreibelt G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Feb;1812(2):141-50.
- Van Toorn R, Schoeman JF, Solomons R, Rensburg MA, van Rensburg SJ. Iron status in children with recurrent episodes of tumefactive cerebral demyelination. *J Child Neurol*. 2010 Nov;25(11):1401-7.
- Vauzour D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:914273.

- Vickrey BG, Hays RD, Harooni R, Myers LW, Ellison GW. A health-related quality of life measure for multiple sclerosis. *Qual Life Res.* 1995 Jun;4(3):187-206.
- Verma SK, Bordia A. Antioxidant property of Saffron in man. *Indian J Med Sci.* 1998 May;52(5):205-7.
- Vincent H.K., Innes K.E., Vincent K.R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes. Metab.* 2007;9:813–839
- von Geldern G, Mowry EM. The influence of nutritional factors on the prognosis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2012 Dec;8(12):678-89
- Vukusic S, Hutchinson M, Hours M, Moreau T, Cortinovis-Tourniaire P, Adeleine P, Confavreux C; Pregnancy In Multiple Sclerosis Group. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMIS study): clinical predictors of post-partum relapse. *Brain.* 2004 Jun;127(Pt 6):1353-60.

## W

- Wang JL, Reimer MA, Metz LM, Patten SB. Major depression and quality of life in individuals with multiple sclerosis. *Int J Psychiatry Med.* 2000;30(4):309-17.
- Malfitano C, Barboza CA, Mostarda C, da Palma RK, dos Santos CP, Rodrigues B, Freitas SC, Belló-Klein A, Llesuy S, Irigoyen MC, De Angelis K. Diabetic hyperglycemia attenuates sympathetic dysfunction and oxidative stress after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Oct 10;13:131.
- Wang Y, Sun J, Liu C, Fang C. Protective effects of crocetin pretreatment on myocardial injury in an ischemia/reperfusion rat model. *Eur J Pharmacol.* 2014 Oct 15;741:290-6.
- Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care.* 1992 Jun;30(6):473-83.
- Warren SA, Svenson LW, Warren KG. Contribution of incidence to increasing prevalence of multiple sclerosis in Alberta, Canada. *Mult Scler.* 2008 Aug;14(7):872-9.
- Watson PE, McDonald BW. Seasonal variation of nutrient intake in pregnancy: effects on infant measures and possible influence on diseases related to season of birth. *Eur J Clin Nutr.* 2007 Nov;61(11):1271-80.
- Weiland TJ, Jelinek GA, Marck CH, Hadgkiss EJ, van der Meer DM, Pereira NG, Taylor KL. Clinically significant fatigue: prevalence and associated factors in an international sample of adults with multiple sclerosis recruited via the internet. *PLoS One.* 2015 Feb 18;10(2):e0115541.
- Weinstock-Guttman B, Baier M, Park Y, Feichter J, Lee-Kwen P, Gallagher E, Venkatraman J, Meksawan K, Deinehert S, Pendergast D, Awad AB, Ramanathan M, Munschauer F, Rudick R. Low fat dietary intervention with omega-3 fatty acid supplementation in multiple sclerosis patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005 Nov;73(5):397-404.
- Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Mahfooz N, Carl E, Drake A, Schneider J, Teter B, Hussein S, Mehta B, Weiskopf M, Durfee J, Bergsland N, Ramanathan M. Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2011 Oct 4;8:127.

- Wens I, Dalgas U, Stenager E, Eijnde BO. Risk factors related to cardiovascular diseases and the metabolic syndrome in multiple sclerosis – a systematic review. *Mult Scler*. 2013 Oct;19(12):1556-64.
- Wesnes K, Myhr KM, Riise T, Cortese M, Pugliatti M, Boström I, Landtblom AM, Wolfson C, Bjørnevik K. Physical activity is associated with a decreased multiple sclerosis risk: The EnvIMS study. *Mult Scler*. 2018 Feb;24(2):150-157.
- Williams CM, Lines CM, McKay EC. Iron and zinc status in multiple sclerosis patients with pressure sores. *Eur J Clin Nutr*. 1988 Apr;42(4):321-8.
- Williams AE, Vietri JT, Isherwood G, Flor A. Symptoms and Association with Health Outcomes in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Results of a US Patient Survey. *Mult Scler Int*. 2014;2014:203183. Doi: 10.1155/2014/203183. Epub 2014 Sep 23.
- Winser S, Smith CM, Hale LA, Claydon LS, Whitney SL, Klatt B, Mottershead J, Zaydan I, Heyman R. Psychometric Properties of a Core Set of Measures of Balance for People With Cerebellar Ataxia Secondary to Multiple Sclerosis. *Arch Phys Med Rehabil*. 2017 Feb;98(2):270-276.
- Wingerchuk DM, Lesaux J, Rice GP, Kremenchutzky M, Ebers GC. A pilot study of oral calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) for relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005 Sep;76(9):1294-6.
- Wozniak-Wowk CS. Nutrition intervention in the management of multiple sclerosis. *Nutr Today* 1993 Dec; 28(6): 12-22
- Wylie SR, Ranatunga KW. Temperature dependence of contraction characteristics in developing rat muscles. *Muscle Nerve*. 1987 Nov-Dec;10(9):775-82

## X

- Xi L, Qian Z, Du P, Fu J. Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats. *Phytomedicine*. 2007a Sep;14(9):633-6.
- Xi L, Qian Z, Xu G, Zheng S, Sun S, Wen N, Sheng L, Shi Y, Zhang Y. Beneficial impact of crocetin, a carotenoid from saffron, on insulin sensitivity in fructose-fed rats. *J Nutr Biochem*. 2007b Jan;18(1):64-72.
- Xu GL, Yu SQ, Gong ZN, Zhang SQ. [Study of the effect of crocin on rat experimental hyperlipemia and the underlying mechanisms]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2005 Mar;30(5):369-72.

## y

- Yang R, Vernon K, Thomas A, Morrison D, Qureshi N, Van Way CW 3rd. Crocetin reduces activation of hepatic apoptotic pathways and improves survival in experimental hemorrhagic shock. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2011 Jan;35(1):107-13.
- Yoshino F, Yoshida A, Umigai N, Kubo K, Lee MC. Crocetin reduces the oxidative stress induced reactive oxygen species in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs) brain. *J Clin Biochem Nutr*. 2011 Nov;49(3):182-7.
- Youdim MB. Iron deficiency effects on brain function. *Public Health Rev*. 2000;28(1-4):83-8.

- Ysrraelit MC, Fiol MP, Gaitán MI, Correale J. Quality of life assessment in multiple sclerosis: Different perception between patients and neurologists. *Fron. Neurol.* 2018 Jan; 8: 729.
- Ytterberg C, Johansson S, Gottberg K, Holmqvist LW, von Koch L. Perceived needs and satisfaction with care in people with multiple sclerosis: a two-year prospective study. *BMC Neurol.* 2008 Sep 29;8:36.

## Z

- Zamani M, Tavoli A, Yazd Khasti B, Sedighimornani N, Zafar M. Sexual Therapy for Women with Multiple Sclerosis and Its Impact on Quality of Life. *Iran J Psychiatry.* 2017 Jan;12(1):58-65.
- Zettl UK, Hecker M, Aktas O, Wagner T, Rommer PS. Interferon  $\beta$ -1a and  $\beta$ -1b for patients with multiple sclerosis: updates to current knowledge. *Expert Rev Clin Immunol.* 2018 Feb;14(2):137-153.
- Zhang X, Fan Z, Jin T. Crocin protects against cerebral- ischemia-induced damage in aged rats through maintaining the integrity of blood-brain barrier. *Restor Neurol Neurosci.* 2017;35(1):65-75.
- Zhao YM, Wang J, Liu HB, Guo CY, Zhang WM. Microwave-assisted Extraction of Alantolactone and Isoalantolactone from *Inula helenium*. *Indian J Pharm.* 2015 Jan-Feb;77(1):116-20.
- Zheng S, Qian Z, Tang F; Sheng L. Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by croctin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Pharmacol.* 2005;70:1192-9.
- Zheng YQ, Liu JX, Wang JN, Xu L. Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. *Brain Res.* 2007 Mar 23;1138:86-94.
- Ziaee T, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Saffron reduced toxic effects of its constituent, safranal, in acute and subacute toxicities in rats. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2014 Feb;9(1):3-8.
- Ziemssen T. Multiple sclerosis beyond EDSS: depression and fatigue. *J Neurol Sci.* 2009 Feb 1;277 Suppl 1:S37-41.



## **7. ANEXOS**





## ANEXO I.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO



#### DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

D./Dña ..... de ..... años de edad y con DNI nº ....., manifiesta que ha sido informado/a sobre el estudio dietético detallado consistente en la participación en entrevistas personales en las que indicará los alimentos que toma habitualmente y en qué cantidad, junto a la cumplimentación de cuestionarios detallados de consumo durante períodos de tiempo determinados, así como la toma de medidas antropométricas y cuestionarios de calidad de vida del paciente; y que también ha sido informado de que se le suministrarán envases de 30 mg de azafrán (Verdú-Cantó Saffron Spain, S.L.) para que lo ingiera diariamente en infusión durante un periodo de 12 a 16 semanas, en el marco de la relación con la Asociación Española de Esclerosis Múltiple de Albacete (ADEM-AB), en cumplimiento de lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (en adelante, LOPD),

#### **CONSIENTE DE MANERA EXPRESA E INEQUÍVOCA**

Para la cesión de sus datos de carácter personal relativos a su nombre y apellidos, patología, hábitos alimenticios, fármacos que ingiere y otros datos relacionados, a la "Cátedra de Química Agrícola de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Albacete" de la Universidad de Castilla-La Mancha y al "Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología" de la Universidad de Murcia, cuya investigadora principal es Magdalena Martínez Tomé, con la finalidad de la realización de estudios e investigaciones de carácter científico en el ámbito de su enfermedad, los cuales, previsiblemente, darán lugar a una tesis doctoral.

En cumplimiento de lo establecido en la LOPD y el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, el interesado puede ejercitar, en cualquier momento, sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, dirigiéndose a: Asociación Española de Esclerosis Múltiple de Albacete (ADEM-AB), con dirección en Calle Ciudad Real, 24, Bajos, 02002 - Albacete, adjuntando fotocopia de su DNI.

He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre.

Doy el consentimiento

Y para que surta plenos efectos legales, firma la presente en

....., a ..... de ..... de .....

Firma del interesado/a:

D./Dña. ....

DNI.....



## **ANEXO II. MULTIPLE SCLEROSIS QUALITY OF LIFE (MSQOL-54)**

# Multiple Sclerosis Quality of Life (MSQOL)-54 Instrument

For Further Information, Contact:

Barbara G. Vickrey, MD, MPH  
UCLA Department of Neurology  
C-128 RNRC; Box 951769  
Los Angeles, CA 90095-1769  
Voice: 310.206.7671  
Fax: 310.794.7716

Copyright© 1995, University of California, Los Angeles

**INSTRUCTIONS:**

This survey asks about your health and daily activities. Answer every question by circling the appropriate number (1, 2, 3, ...).

**If you are unsure about how to answer a question, please give the best answer you can and write a comment or explanation in the margin.**

Please feel free to ask someone to assist you if you need help reading or marking the form.

1. In general, would you say your health is:  
(circle one number)

- Excellent.....1
- Very good.....2
- Good.....3
- Fair.....4
- Poor.....5

2. **Compared to one year ago**, how would you rate your health in general **now**?

(circle one number)

- Much better now than one year ago ..... 1
- Somewhat better now than one year ago.....2
- About the same..... 3
- Somewhat worse now than one year ago..... 4
- Much worse now than one year ago..... 5

- 3-12. The following questions are about activities you might do during a typical day. Does **your health** limit you in these activities? If so, how much?

(Circle 1, 2, or 3 on each line)

	Yes, Limited a Lot	Yes, Limited a Little	No, Not Limited at All
3. <b>Vigorous activities</b> , such as running, lifting heavy objects, participating in strenuous sports	1	2	3
4. <b>Moderate activities</b> , such as moving a table, pushing a vacuum cleaner, bowling, or playing golf	1	2	3
5. Lifting or carrying groceries	1	2	3
6. Climbing <b>several</b> flights of stairs	1	2	3
7. Climbing <b>one</b> flight of stairs	1	2	3
8. Bending, kneeling, or stooping	1	2	3
9. Walking <b>more than a mile</b>	1	2	3
10. Walking <b>several blocks</b>	1	2	3
11. Walking <b>one block</b>	1	2	3
12. Bathing and dressing yourself	1	2	3

- 13-16. During the **past 4 weeks**, have you had any of the following problems with your work or other regular daily activities **as a result of your physical health?**

(Circle one number on each line)

	YES	NO
13. Cut down on the <u>amount of time</u> you could spend on work or other activities	1	2
14. <u>Accomplished less</u> than you would like	1	2
15. Were limited in the <u>kind</u> of work or other activities	1	2
16. Had <u>difficulty</u> performing the work or other activities (for example, it took extra effort)	1	2

- 17-19. During the **past 4 weeks**, have you had any of the following problems with your work or other regular daily activities **as a result of any emotional problems** (such as feeling depressed or anxious).

(Circle one number on each line)

	YES	NO
17. Cut down on the <u>amount of time</u> you could spend on work or other activities	1	2
18. <u>Accomplished less</u> than you would like	1	2
19. Didn't do work or other activities as <u>carefully</u> as usual	1	2

20. During the **past 4 weeks**, to what extent has your physical health or emotional problems interfered with your normal social activities with family, friends, neighbors, or groups?

(circle one number)

- Not at all ..... 1  
Slightly ..... 2  
Moderately ..... 3  
Quite a bit ..... 4  
Extremely ..... 5

### Pain

21. How much **bodily** pain have you had during the **past 4 weeks**?

(circle one number)

- None ..... 1  
Very mild ..... 2  
Mild ..... 3  
Moderate ..... 4  
Severe ..... 5  
Very severe ..... 6

22. During the **past 4 weeks**, how much did **pain** interfere with your normal work (including both work outside the home and housework)?

(circle one number)

- Not at all ..... 1  
A little bit ..... 2  
Moderately ..... 3  
Quite a bit ..... 4  
Extremely ..... 5

23-32. These questions are about how you feel and how things have been with you **during the past 4 weeks**. For each question, please give the one answer that comes closest to the way you have been feeling.

How much of the time during the **past 4 weeks**...

(Circle one number on each line)

	All of the Time	Most Of the Time	A Good Bit of the Time	Some of the Time	A Little of the Time	None of the Time
23. Did you feel full of pep?	1	2	3	4	5	6
24. Have you been a very nervous person?	1	2	3	4	5	6
25. Have you felt so down in the dumps that nothing could cheer you up?	1	2	3	4	5	6
26. Have you felt calm and peaceful?	1	2	3	4	5	6
27. Did you have a lot of energy?	1	2	3	4	5	6
28. Have you felt downhearted and blue?	1	2	3	4	5	6
29. Did you feel worn out?	1	2	3	4	5	6
30. Have you been a happy person?	1	2	3	4	5	6
31. Did you feel tired?	1	2	3	4	5	6
32. Did you feel rested on waking in the morning?	1	2	3	4	5	6

33. During the **past 4 weeks**, how much of the time has your **physical health or emotional problems** interfered with your social activities (like visiting with friends, relatives, etc.)?

(circle one number)

All of the time ..... 1

Most of the time..... 2

Some of the time ..... 3

A little of the time..... 4

None of the time ..... 5

#### Health in General

- 34-37. How TRUE or FALSE is each of the following statements for you.

(Circle one number on each line)

	Definitely True	Mostly True	Not Sure	Mostly False	Definitely False
34. I seem to get sick a little easier than other people	1	2	3	4	5
35. I am as healthy as anybody I know	1	2	3	4	5
36. I expect my health to get worse	1	2	3	4	5
37. My health is excellent	1	2	3	4	5

**Health Distress**

How much of the time during the **past 4 weeks...**

(Circle one number on each line)

	All of the Time	Most of the Time	A Good Bit of the Time	Some of the Time	A Little of the Time	None of the Time
38. Were you discouraged by your health problems?	1	2	3	4	5	6
39. Were you frustrated about your health?	1	2	3	4	5	6
40. Was your health a worry in your life?	1	2	3	4	5	6
41. Did you feel weighed down by your health problems?	1	2	3	4	5	6

**Cognitive Function**

How much of the time during the **past 4 weeks...**

(Circle one number on each line)

	All of the Time	Most of the Time	A Good Bit of the Time	Some of the Time	A Little of the Time	None of the Time
42. Have you had difficulty concentrating and thinking?	1	2	3	4	5	6
43. Did you have trouble keeping your attention on an activity for long?	1	2	3	4	5	6
44. Have you had trouble with your memory?	1	2	3	4	5	6
45. Have others, such as family members or friends, noticed that you have trouble with your memory or problems with your concentration?	1	2	3	4	5	6

### Sexual Function

46-50. The next set of questions are about your sexual function and your satisfaction with your sexual function. Please answer as accurately as possible about your function **during the last 4 weeks only.**

How much of a problem was each of the following for you **during the past 4 weeks?**

(Circle one number on each line)

<b>MEN</b>	Not a problem	A Little of a Problem	Somewhat of a Problem	Very Much a Problem
46. Lack of sexual interest	1	2	3	4
47. Difficulty getting or keeping an erection	1	2	3	4
48. Difficulty having orgasm	1	2	3	4
49. Ability to satisfy sexual partner	1	2	3	4

(Circle one number on each line)

<b>WOMEN</b>	Not a problem	A Little of a Problem	Somewhat of a Problem	Very Much a Problem
46. Lack of sexual interest	1	2	3	4
47. Inadequate lubrication	1	2	3	4
48. Difficulty having orgasm	1	2	3	4
49. Ability to satisfy sexual partner	1	2	3	4

50. Overall, how satisfied were you with your sexual function **during the past 4 weeks**?

(circle one number)

- Very satisfied ..... 1
- Somewhat satisfied ..... 2
- Neither satisfied nor  
dissatisfied ..... 3
- Somewhat dissatisfied ..... 4
- Very dissatisfied ..... 5

51. During the **past 4 weeks**, to what extent have problems with your bowel or bladder function interfered with your normal social activities with family, friends, neighbors, or groups?

(circle one number)

- Not at all..... 1
- Slightly ..... 2
- Moderately ..... 3
- Quite a bit..... 4
- Extremely ..... 5

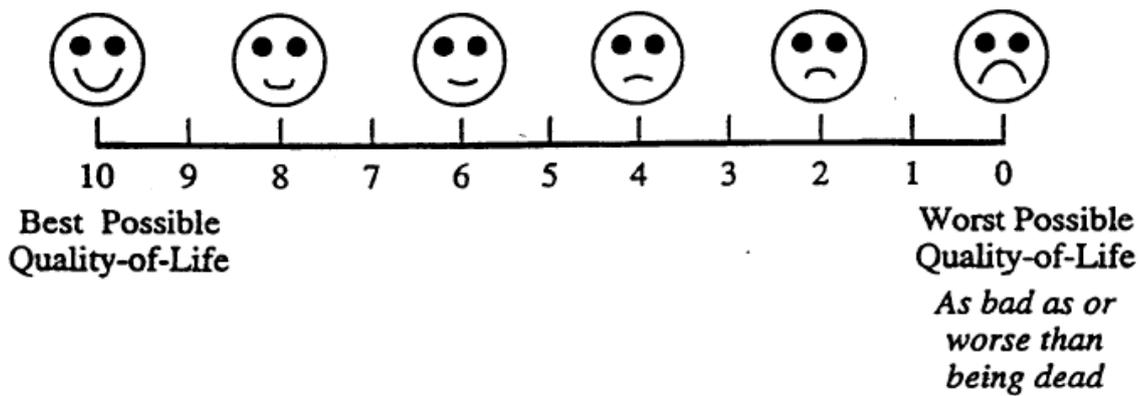
52. During the **past 4 weeks**, how much did *pain* interfere with your enjoyment of life?

(circle one number)

- Not at all..... 1
- Slightly ..... 2
- Moderately ..... 3
- Quite a bit..... 4
- Extremely ..... 5

53. Overall, how would you rate your own quality-of-life?

Circle one number on the scale below:



54. Which best describes how you feel about your life as a whole?

(circle one number)

- Terrible ..... 1
- Unhappy.....2
- Mostly dissatisfied .....3
- Mixed - about equally satisfied and dissatisfied ..... 4
- Mostly satisfied.....5
- Pleased .....6
- Delighted.....7

---

**ANEXO 3. ÍNDICE DE KATZ (traducción del original de [www.medal.org](http://www.medal.org))**  
**Índice de independencia en Actividades de la Vida Diaria (ADL)**

-La palabra “Asistencia” significa: supervisión, dirección o asistencia personal.

Actividades de la Vida Diaria:

1. BAÑO (baño con esponja, en bañera o ducha):
  - No recibe asistencia (entra y sale por sí mismo de la bañera si es su lugar habitual de baño). (Independiente)
  - Recibe asistencia en el baño sólo para una parte del cuerpo (como la espalda o una pierna). (Intermedio)
  - Recibe asistencia en el baño para más de una parte del cuerpo, o si no, no se baña. (Dependiente).
2. VESTIDO (Coger las ropas del armario, incluida ropa interior)
  - El paciente coge la ropa y se viste completamente sin asistencia. (Independiente)
  - Coge la ropa y se viste sin asistencia excepto para atarse los cordones de los zapatos. (Intermedio)
  - Recibe asistencia para coger la ropa y vestirse, o permanece completa o parcialmente desvestido. (Dependiente).
3. LAVABO (Ir al lavabo para deposición y micción, limpiarse por sí mismo después y arreglarse la ropa)
  - Va al lavabo, se limpia por sí mismo y se arregla la ropa sin asistencia. (Independiente)
  - Recibe asistencia para ir al lavabo o para limpiarse o para arreglarse la ropa o en uso de cuña o inodoro. (Intermedio)
  - No va al lavabo para deposición o micción. (Dependiente)
4. TRASLADOS
  - Entra y sale de la cama, se sienta y se levanta de la silla sin asistencia. (Independiente)
  - Entra y sale de la cama o se sienta y se levanta de la silla con asistencia. (Intermedio)
  - No se levanta de la cama (Dependiente)
5. CONTINENCIA
  - Controla completamente por sí mismo los movimientos de micción y deposición. (Independiente)
  - Tiene “accidentes” ocasionales. (Intermedio)
  - Controla la micción o deposición con ayuda de supervisión, usa catéter, o es incontinente. (Dependiente)

## 6. ALIMENTACIÓN

- Come por sí mismo sin asistencia. (Independiente)
- Come por sí mismo menos cuando necesita asistencia para cortar la carne o extender la mantequilla. (Intermedio)
- Recibe asistencia para comer o es alimentado parcial o completamente mediante tubos o fluidos intravenosos. (Dependiente)

<b>GRADO</b>	<b>Descripción</b>
A	Independiente en todas las 6 funciones
B	Independiente en todas menos en una de las 6 funciones
C	Dependiente en baño y otra función
D	Dependiente en baño, vestido y otra función
E	Dependiente en baño, vestido, lavabo y otra función
F	Dependiente en baño, vestido, lavabo, traslados y otra función
G	Dependiente en todas las 6 funciones
otro	Dependiente en al menos 2 funciones pero no clasificado como C, D, E o F.

## **ANEXO IV. ÍNDICE DE BARTHEL**

### **1. COMER**

- Totalmente independiente = 10
- Necesita ayuda para cortar la carne, el pan, etc.= 5
- Dependiente =0

### **2. LAVARSE**

- Independiente. Entra y sale solo al baño = 5
- Dependiente =0

### **3. VESTIRSE**

- Independiente. Se pone y se quita la ropa. Se ata los zapatos. Se abotona = 10
- Necesita ayuda = 5
- Dependiente = 0

### **4. ARREGLARSE**

- Independiente para lavarse la cara, las manos, peinarse, afeitarse, etc = 5
- Dependiente = 0

### **5. DEPOSICIONES**

- Continente = 10
- Ocasionalmente, tiene algún episodio de incontinencia, o precisa de ayuda para lavativas = 5
- Incontinente = 0

## **6. MICCIÓN**

- Contiente o es capaz de cuidarse la sonda = 10
- Ocasionalmente, tiene un episodio de incontinencia cada 24 horas como máximo, o precisa ayuda para la sonda = 5
- Incontinente = 0

## **7. USAR EL RETRETE**

- Independiente para ir al WC, quitarse y ponerse la ropa = 10
- Necesita ayuda para ir al WC, pero se limpia solo = 5
- Dependiente = 0

## **8. TRASLADARSE**

- Independiente para ir del sillón a la cama = 15
- Mínima ayuda física o supervisión = 10
- Gran ayuda pero es capaz de mantenerse sentado sin ayuda = 5
- Dependiente = 0

## **9. DEAMBULAR**

- Independiente, camina solo 50 metros = 15
- Necesita ayuda física o supervisión para caminar 50 metros. 10
- Independiente en silla de ruedas sin ayuda = 5
- Dependiente = 0

## **10. ESCALONES**

- Independiente para subir y bajar escaleras = 10
- Necesita ayuda o supervisión = 5
- Dependiente = 0

---

<b>Máxima puntuación: 100 puntos (90 en el caso de ir con silla de ruedas)</b>
<b>Dependencia total &lt; 20</b>
<b>Dependiente grave 20 - 35</b>
<b>Dependiente moderado 40 - 55</b>
<b>Dependiente leve &gt; 60</b>



**ANEXO V. ESCALA DE TINETTI****ESCALA TINETTI PARA EQUILIBRIO**

El paciente está sentado en una silla rígida, sin apoyo para brazos.

*Equilibrio sentado*

- 0 - se inclina o se desliza de la silla
- 1 - está estable, seguro

*Levantarse de la silla*

- 0 - es incapaz sin ayuda
- 1 - se debe ayudar con los brazos
- 2 - se levanta sin usar los brazos

*En el intento de levantarse*

- 0 - es incapaz sin ayuda
- 1 - es capaz pero necesita más de un intento
- 2 - es capaz al primer intento

*Equilibrio de pié (los primeros 5 segundos)*

- 0 - inestable (vacila, mueve los pies, marcada oscilación del tronco)
- 1 - estable gracias al bastón u otro auxilio para sujetarse
- 2 - estable sin soportes o auxilios

*Equilibrio de pié prolongado*

- 0 - inestable (vacila, mueve los pies, marcada oscilación del tronco)
- 1 - estable pero con base de apoyo amplia (maleolos mediales > 10cm) o usa auxilio
- 2 - estable con base de apoyo estrecha, sin soportes o auxilios

*Romberg sensibilizado* (con ojos abiertos, pies juntos, empujar levemente con la palma de la mano sobre el esternón del sujeto en 3 oportunidades)

- 0 - comienza a caer
- 1 - oscila, pero se endereza solo
- 2 - estable

*Romberg* (con ojos cerrados e igual que el anterior)

- 0 - inestable

1 – estable

*Girar en 360º*

0 - con pasos discontinuos o movimiento no homogéneo

1 - con pasos continuos o movimiento homogéneo

0 - inestable (se sujeta, oscila)

1 – estable

*Sentarse*

0 - inseguro (equivoca distancia, cae sobre la silla)

1 - usa los brazos o tiene un movimiento discontinuo

2 - seguro, movimiento continuo

**PUNTAJE EQUILIBRIO \_\_\_\_\_/16**

**ESCALA DE TINETTI PARA LA MARCHA**

El paciente está de pie; debe caminar a lo largo, inicialmente con su paso habitual, luego con un paso más rápido pero seguro. Puede usar auxilios.

*Inicio de la deambulaci3n (inmediatamente despu3s de la partida)*

0 - con una cierta inseguridad o m3s de un intento

1 - ninguna inseguridad

*Longitud y altura del paso*

*Pi3 derecho*

0 - durante el paso el pi3 derecho no supera al izquierdo

1 - el pi3 derecho supera al izquierdo

0 - el pi3 derecho no se levanta completamente del suelo

1 - el pi3 derecho se levanta completamente del suelo

*Pi3 izquierdo*

0 - durante el paso el pi3 izquierdo no supera al derecho

1 - el pi3 izquierdo supera al derecho

0 - el pi3 izquierdo no se levanta completamente del suelo

1 - el pi3 izquierdo se levanta completamente del suelo

*Simetría del paso*

0 - el paso derecho no parece igual al izquierdo

1 - el paso derecho e izquierdo parecen iguales

*Continuidad del paso*

**0** - interrumpido o discontinuo (detenciones o discordancia entre los pasos)

**1** - continuo

Trayectoria

**0** - marcada desviación

**1** - leve o moderada desviación o necesidad de auxilios

**2** - ausencia de desviación y de uso de auxilios

Tronco

**0** - marcada oscilación

**1** - ninguna oscilación, pero flexión rodillas, espalda, o abre los brazos durante la marcha

**2** - ninguna oscilación ni flexión ni uso de los brazos o auxilios

Movimiento en la deambulaci3n

**0** - los talones est1n separados

**1** - los talones casi se tocan durante la marcha

**PUNTAJE MARCHA** \_\_\_\_\_/12

**SUMA DE PUNTAJES: EQUILIBRIO + MARCHA:** \_\_\_\_\_/28





## **8. ABREVIATURAS**



## 8. ABREVIATURAS

- ADEM-AB:** Asociación Española de Esclerosis Múltiple en Albacete
- ADME:** Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
- AGL:** Ácidos Grasos Libres
- AGPI:** Ácidos Grasos Poliinsaturados
- AGS:** Ácidos Grasos Saturados
- AVD:** Actividades de la Vida Diaria
- BHE:** Barrera Hematoencefálica
- BOC:** Bandas Oligoclonales
- C.A.E.:** Código Alimentario Español
- CFC:** Cuestionario de Frecuencia de Consumo
- CIEN:** Centro Integral de Enfermedades Neurológicas
- CSSN:** Conozca su Salud Nutricional
- CV:** Calidad de Vida
- CVRS:** Calidad de vida relacionada con la salud
- DHA:** Ácido docosahexaenoico
- DL50:** Dosis Letal media
- DOP:** Denominación de Origen Protegida
- EAE:** Encefalomiелitis Autoinmune Experimental
- EC:** Ensayo Clínico
- EDSS:** Kurtzek Expanded Disability Status Scale
- EM:** Esclerosis Múltiple
- EMPP:** Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva
- EMPR:** Esclerosis Múltiple Progresiva Recurrente
- EMRR:** Esclerosis Múltiple Recurrente Remitente
- EMSP:** Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva
- EPA:** Ácido Eicosapentaenoico
- EQ-5D:** EuroQoL-5D
- ET:** Escala Temporal
- EVA:** Escala Visual Analógica
- HDL:** Lipoproteínas de Alta Densidad

**HPLC-DAD:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Diodos Alineados

**IB:** Índice de Barthel

**IDR:** Ingesta Dietética de Referencia

**IK:** Índice de Katz

**IMC:** Índice de Masa Corporal

**LCR:** Líquido Cefalorraquídeo

**LP:** Lipasa Pancreática

**MAO-A:** Monoamino Oxidasa A

**MAO-B:** Monoamino Oxidasa B

**MMT:** Masa Muscular Total

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**PE:** Potenciales Evocados

**RMI:** Resonancia magnética de imagen

**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno

**SB:** Sustancia Blanca

**SCA:** Síndrome Clínico Aislado

**SF-36:** Short Form-36

**SG:** Sustancia Gris

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SOD:** Superóxido Dismutasa

**TLC:** Cromatografía de Capa Fina

**TSC:** *trans*-Sodio Crocetinato

**UV-V:** Ultravioleta-Visible



## ***9. ÍNDICE DE TABLAS***



<b>9. ÍNDICE DE TABLAS</b>	Página
Tabla 1. Composición química aproximada del azafrán especia	12
Tabla 2. Estructura de los esteres de crocetina (crocinas)	15
Tabla 3. Síntomas en el curso de la enfermedad y frecuencia de los mismos	48
Tabla 4. Definiciones para identificar los fenotipos de EM	52
Tabla 5. Tratamientos modificadores de la EM	56
Tabla 6. Tratamiento sintomático de la EM	57
Tabla 7. Descripción de los estudios incluidos en la revisión	62
Tabla 8. Dosis y duración de ácidos grasos poliinsaturados y vitamina D administrados en los ensayos clínicos	66
Tabla 9. Categorización del azafrán según su poder colorante, picrocrocina y safranal	88
Tabla 10. Parámetros de las rectas de calibrado para cada uno de los compuestos analizados del azafrán	91
Tabla 11. Descripción de las características demográficas y clínicas de la población estudiada	115
Tabla 12. Descripción de ensayos clínicos desde 2009-2014	117
Tabla 13. Resultados de las absorbancias en el UV-Vis a 257 nm (poder amargo), 330 nm (poder aromático) y 440 nm (poder colorante) del azafrán en hebra, triturado y molido	121
Tabla 14. Áreas de los picos cromatográficos a las longitudes de onda ( $\lambda$ ) correspondientes a los máximos de absorción de safranal, picrocrocina y de las principales crocinas al tiempo de infusión muestreado (t) obtenidos mediante HPLC-DAD	124
Tabla 15. Absorbancias (A) y coeficientes de extinción (E) de las muestras estudiadas a las diferentes longitudes de onda donde aparecen los compuestos bioactivos del azafrán en UV-V según la Norma ISO 3632 (2011) en los tres controles realizados al inicio de origen), 45 días y 93 días	127
Tabla 16. Control de las concentraciones de safranal, picrocrocina y crocinas trans de las muestras administradas a los pacientes expresadas en mg/100mg de azafrán por el método HPLC-DAD al inicio (calidad de origen), 45 días y 93 días	128

Tabla 17.	Control de las concentraciones de las crocinas <i>cis</i> de las muestras administradas a los pacientes expresadas en mg/100mg de azafrán por el método HPLC-DAD al inicio (calidad de origen), 45 días y 93 días	129
Tabla 18.	Control de las concentraciones de suma total de crocinas, suma crocinas <i>trans</i> , suma crocinas <i>cis</i> , expresadas en mg/100mg de azafrán, por el método HPLC-DAD al inicio (calidad de origen), 45 días y 93 días. Relación crocinas <i>cis</i> / <i>trans</i> en porcentaje.	130
Tabla 19.	Descripción de los parámetros bioquímicos de la población estudiada antes y después de la ingesta de infusión de azafrán	134
Tabla 20.	Descripción de los valores antropométricos de la población estudiada antes y después de la ingesta de azafrán	143
Tabla 21.	Ingesta media a partir de raciones de alimentos, antes y después de la intervención del cuestionario CFC	149
Tabla 22.	Distribución porcentual de la frecuencia de consumo por grupos de alimentos de la población estudiada y su relación con las raciones recomendadas en la pirámide de alimentación saludable (SENC, 2016), antes y después de la intervención, mediante el cuestionario CFC	153
Tabla 23.	Distribución porcentual de la ingesta de energía, macronutrientes, perfil lipídico y fibra de la población estudiada y su relación con las recomendaciones establecidas, de la intervención, en base al CFC	156
Tabla 24.	Valores medios y porcentaje de pacientes que se ajustan a las IDRs de ingesta diaria de energía, macronutrientes, minerales y vitaminas, en los pacientes, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al cuestionario de Recuerdo 24 horas	163
Tabla 25.	Porcentaje de pacientes con respuesta afirmativa al cuestionario CSSN, antes y después, de la intervención	166
Tabla 26.	Valoración del riesgo nutricional obtenida mediante el cuestionario CSSN, antes y después de la intervención	167
Tabla 27.	Descripción de los resultados del EuroQol-5D, expresado en porcentaje de pacientes e indicadores de calidad de vida, antes y después de la intervención	172
Tabla 28.	Puntuación física y mental global obtenida con el cuestionario MSQOL-54, antes y después de la intervención	176



## ***10. ÍNDICE DE FIGURAS***



<b>10. ÍNDICE DE FIGURAS</b>		<b>Página</b>
Figura 1.	Flor de <i>Crocus sativus</i> L	10
Figura 2.	Estigmas de <i>Crocus sativus</i> L	10
Figura 3.	Ofrenda de estigmas a la diosa	13
Figura 4.	Formulación con azafrán recogida en la IX edición de la Farmacopea Española	13
Figura 5.	Estructura de la crocetina	14
Figura 6.	Estructura de la picrocrocina	17
Figura 7.	Estructura del safranal	17
Figura 8.	Generación del safranal	18
Figura 9.	Esquema de la biodisponibilidad	19
Figura 10.	Paso de la crocetina a través de la barrera hematoencefálica	21
Figura 11.	Propuesta de ruta metabólica tras la administración oral de crocetina y crocinas	22
Figura 12.	Esquema de la formación y desintoxicación de las especies reactivas de oxígeno	27
Figura 13.	Posibles enfoques farmacológicos y nutricionales con influencia inmunomodulatoria en el estado de activación microglial durante el envejecimiento o deterioro neuronal	30
Figura 14.	Reoxigenación con <i>trans</i> -sodio crocetinato	35
Figura 15.	Posibles efectos antiobesidad de los componentes del azafrán	41
Figura 16.	Fibra nerviosa desmielinizada	45
Figura 17.	Bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo	49
Figura 18.	Estudio evolutivo con RMI en un paciente con EM	50
Figura 19.	Fenotipos de la EM en brotes, 1996 vs 2013	53
Figura 20.	Fenotipos clínicos descriptivos de la EM progresiva, 1996 vs 2013	54
Figura 21.	Diagrama de flujo que muestra la búsqueda bibliográfica	60
Figura 22.	Filtrado de la solución a través de un filtro PTFE	89
Figura 23.	Preparación de las muestras de 20 $\mu$ L del extracto acuoso para su inyección en el equipo de HPLC-DAD.	90

Figura 24.	Evaluación del grado de extracción a lo largo del tiempo	93
Figura 25.	Azafrán molido	118
Figura 26.	Diferencias entre molido y triturado	118
Figura 27.	Extracción acuosa del formato hebra.	119
Figura 28.	Barrido UV-Vis desde 190 a 700 nm de la infusión del azafrán en hebra	119
Figura 29.	Barrido espectrofotométrico en el UV-Visible desde 190 a 700nm de la infusión de azafrán triturado	120
Figura 30.	Barrido espectrofotométrico en el UV-Visible desde 190 a 700nm de la infusión de azafrán molido	120
Figura 31a.	Cinética obtenidas del UV-vis a 257 nm (picrocrocina) de una infusión de azafrán en formato hebra, triturado y molido.	122
Figura 31b.	Cinética obtenidas del UV-vis a 330 nm (safranal) de una infusión de azafrán en formato hebra, triturado y molido	122
Figura 31c.	Cinética obtenida del UV-vis a 440 nm (crocinas) de una infusión de azafrán en formato hebra, triturado y molido	122
Figura 32a.	Cinética obtenida por HPLC-DAD para picrocrocina en azafrán molido	125
Figura 32b.	Cinética obtenida por HPLC-DAD para safranal en azafrán molido.	125
Figura 32c.	Cinética obtenida por HPLC-DAD para crocinas <i>trans</i> -4-GG y <i>trans</i> -3-Gg en azafrán molido	125
Figura 32d.	Cinética obtenida por HPLC-DAD para crocinas <i>trans</i> -2-gg, <i>cis</i> -4-GG y <i>cis</i> -3-Gg en azafrán molido	125
Figura 33.	Presentación de las cajas conteniendo el azafrán	126
Figura 34.	Distribución de los valores medios de la ingesta calórica expresada en Kcal/kg peso; macronutrientes expresados en % de aporte calórico; perfil lipídico, expresado en % de aporte a la ingesta calórica, colesterol (mg/1000 Kcal); y fibra (g/1000Kcal), antes y después de la intervención	154
Figura 35.	Porcentaje de ajuste a las IDRs de energía, macronutrientes, perfil lipídico y fibra en la población estudiada, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al CFC.	157

Figura 36.	Porcentaje de ajuste a las IDRs de vitaminas en la población estudiada, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al CFC.	160
Figura 37.	Porcentaje de ajuste a las IDRs de minerales en la población estudiada, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al CFC.	162
Figura 38.	Porcentaje de ajuste a las IDRs de energía, macronutrientes, perfil lipídico y fibra en la población estudiada, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al cuestionario Recuerdo 24 horas	164
Figura 39.	Porcentaje de ajuste a las IDRs de minerales, en los pacientes, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al cuestionario de Recuerdo 24 horas	165
Figura 40.	Porcentaje de ajuste a las IDRs de vitaminas, en los pacientes, antes y después de la ingesta de azafrán, en base al cuestionario de Recuerdo 24 horas	165
Figura 41.	Descripción de los resultados del cuestionario MSQOL-54, antes y después de la ingesta de azafrán	176
Figura 42.	Distribución porcentual en función de las categorías de dependencia (A-H) del índice de Katz, antes y después de la intervención	183
Figura 43.	Distribución porcentual de independencia para las seis tareas evaluadas mediante el índice de Katz, antes y después de la intervención	184
Figura 44.	Distribución porcentual de independencia mediante el índice de Barthel, antes y después de la intervención	186
Figura 45.	Distribución porcentual de independencia para las diez tareas evaluadas mediante el índice de Barthel, antes y después de la intervención	187
Figura 46.	Descripción de los resultados del test de Tinetti, antes y después de la ingesta de azafrán	191





## ***11. RESUMEN***



## 11. RESUMEN

Son numerosos los estudios científicos en los últimos diez años que destacan las propiedades biomédicas y farmacológicas del azafrán o de alguno de sus metabolitos en la prevención y desarrollo de diversas enfermedades crónicas.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, degenerativa, de base autoinmune del sistema nervioso central (SNC). Esta enfermedad tiene un componente inflamatorio muy importante ya que las alteraciones en la respuesta inmunitaria conllevan a la inflamación presente en las lesiones, desmielinización y pérdida axonal. La presencia de rasgos de autoinmunidad y defectos en la producción de enzimas antioxidantes son factores de riesgo para padecer la enfermedad.

No hay suficientes estudios que informen sobre la influencia de la dieta como factor ambiental de riesgo en la EM, hábitos alimenticios que eviten el estado crónico de inflamación y el agravamiento de la enfermedad. En modelos experimentales de lesión neurodegenerativa en animales, se comprueba que los astrocitos, en su papel neuroprotector, liberan mediadores inflamatorios en las zonas lesionadas, produciendo la reacción inflamatoria, responsable del estrés oxidativo que llevará a la degradación de la mielina y el daño axonal.

En la EM las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel muy importante en la fase inicial y crónica de la enfermedad y la restauración del balance redox en los tejidos cerebrales puede ser una buena estrategia terapéutica para limitar la neuroinflamación y el daño oxidativo tisular.

La intervención planteada en esta tesis observa si el azafrán especia, tomado en infusión, contribuye eficazmente a la salud de los enfermos de EM. La mayoría de las propiedades preventivas o curativas en enfermedades crónicas y degenerativas atribuidas al azafrán, son fundamentadas en el carácter antioxidante de sus apocarotenoides, aunque los mecanismos de acción no están

suficientemente estudiados sí está demostrada la gran capacidad antioxidante del azafrán debido a su alto contenido en carotenoides.

En la presente Tesis Doctoral se muestran las mejores condiciones para obtener la máxima extracción de los metabolitos bioactivos del azafrán (crocinas, picrocrocina y safranal), considerando que la mejor determinación de estos debe realizarse mediante HPLC-DAD y, no así, con la utilización de la metodología descrita en la Norma ISO3632 basada en UV-vis.

Tras la toma de la infusión de azafrán se observa en los pacientes una tendencia a la mejora del perfil lipídico, con disminución del colesterol total, triglicéridos y LDL-colesterol y aumento del HDL colesterol. Esta diferencia no es significativa y deberá investigarse en estudios posteriores con mayor número de pacientes. También se observa una disminución de la grasa corporal y densidad corporal tricípital.

La calidad de vida relacionada con la salud de los pacientes mejora significativamente tras la intervención. Disminuyen las dificultades de concentración, atención y memoria; los problemas emocionales, como depresión o ansiedad; y la percepción respecto a sus limitaciones para realizar actividades en relación a su vida diaria. Mejora la autopercepción de los pacientes respecto a su estado de salud. Además, aumentan sus relaciones sociales e interfiere menos en ellas los problemas de salud o emocionales. Respecto a su sexualidad, aumenta significativamente la satisfacción de los pacientes.



## ***12. SUMMARY***



## 12. SUMMARY

There are numerous scientific studies in the last ten years that highlight the biomedical and pharmacological properties of saffron or some of its metabolites in the prevention and development of various chronic diseases.

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, degenerative, autoimmune-based disease of the central nervous system (CNS). This disease has a very important inflammatory component since alterations in the immune response lead to inflammation present in the lesions, demyelination and axonal loss. The presence of autoimmunity traits and defects in the production of antioxidant enzymes are risk factors for the disease.

There are not enough studies that report on the influence of diet as an environmental risk factor in MS, eating habits that avoid the chronic state of inflammation and the aggravation of the disease. In experimental models of neurodegenerative injury in animals, it is found that astrocytes, in their neuroprotective role, release inflammatory mediators in the injured areas, producing the inflammatory reaction, responsible for oxidative stress that will lead to the degradation of myelin and axonal damage.

In MS, reactive oxygen species (ROS) play a very important role in the initial and chronic phase of the disease and restoration of the redox balance in brain tissues may be a good therapeutic strategy to limit neuroinflammation and tissue oxidative damage.

The intervention proposed in this thesis notes whether the saffron spice, taken in infusion, effectively contributes to the health of MS patients. Most of the preventive or curative properties in chronic and degenerative diseases, attributed to saffron, are based on the antioxidant character of its apocarotenoids, although

the mechanisms of action are not sufficiently studied, the great antioxidant capacity of saffron is demonstrated due to its high content of carotenoids.

This Doctoral Thesis shows the best conditions to obtain the maximum extraction of the bioactive metabolites of saffron (crocin, picrocrocin and safranal), considering that the best determination of these should be done by HPLC-DAD and, not, with the use of the methodology described in ISO3632 based on UV-vis.

After taking the saffron infusion, patients appreciate a tendency to improve the lipid profile, with a decrease in total cholesterol, triglycerides and LDL-cholesterol and an increase in HDL cholesterol. This difference is not significant and should be investigated in subsequent studies with a larger number of patients. There is also a decrease in body fat and triceps body density.

The quality of life related to the health of patients improves significantly after the intervention. They reduced the difficulties of concentration, attention and memory; emotional problems, such as depression or anxiety; and the perception regarding their limitations to carry out activities in relation to their daily life. It improves the self-perception of patients regarding their state of health. In addition, they increase their social relations and interfere less with health or emotional problems. Regarding their sexuality, significantly increases the satisfaction of patients.