

ENCUENTROS EN NEUROCIENCIAS VOL. I

JIMÉNEZ DIAZ L. & NAVARRO LÓPEZ J.D. (eds.)



Instituto
Neurociencias
Federico Olóriz



ENCUENTROS EN NEUROCIENCIAS VOL. I

JIMÉNEZ DIAZ L. & NAVARRO LÓPEZ J.D. (eds.)

Granada, 2011



© De cada capítulo, sus autores. 2011.



El presente trabajo se distribuye bajo licencia Reconocimiento-CompartirIgual (by-sa) - Creative Commons 3.0 España.

<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/es/>

Usted es libre de:



copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.



hacer obras derivadas.



<http://freedomdefined.org/Definition>

Bajo las condiciones siguientes:



Reconocimiento. Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciadore (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).



Compartir bajo la misma licencia. Si altera o transforma esta obra, o genera una obra derivada, sólo puede distribuir la obra generada bajo una licencia idéntica a ésta.

- Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.
- Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.
- Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.

ISBN: 978-1-4461-2634-9

PARTICIPANTES

AUTORES

CAPITULO 1

Jennifer Mayordomo Cava
Juan de Dios Navarro-López
Lydia Jiménez-Díaz

CAPITULO 2

Cristina Sánchez Fernández
Enrique J. Cobos
Rafael González-Cano
Daniel Zamanillo
Esperanza Del Pozo

CAPITULO 3

Esther Molina
Jorge A. Cervilla
Margarita Rivera
Francisco Torres-González
Blanca Gutiérrez

CAPITULO 4

Inmaculada Ibañez-Casas
Jorge A. Cervilla Ballesteros

CAPITULO 5

José M. Rodríguez-Ferrer,
Rafael Mancebo-Azor,
Raquel Gutiérrez,
Miguel A. Pugnaire,
Luís F. Canava

CAPITULO 6

Bárbara Rapela Orta
Eva M. Rodríguez Torrecillas
Iris Crespo Martín
José M. Rodríguez Ferrer

CAPITULO 7

Iris Crespo Martín
Bárbara Rapela Orta
Eva M. Rodríguez Torrecillas
Rafael Mancebo Azor
José M. Rodríguez Ferrer

CAPITULO 8

Eva M. Rodríguez Torrecillas
Iris Crespo Martín
Bárbara Rapela Orta
Rafael Mancebo Azor
José M. Rodríguez Ferrer

CAPITULO 9

Elena Delgado-Rico
Natalia Albein Urios
Emilio González Jiménez
Jacqueline Schmidt
Francisco Cruz
Miguel Pérez-García
Cristina Campoy
Antonio Verdejo-García

CAPITULO 10

Fernando Gámiz
Milagros Gallo

CAPITULO 11

Pilar Sánchez
Jesús M. Torres
Beatriz Castro
Esperanza Ortega

CAPITULO 12

Raquel Durán
Francisco J. Barrero
Blas Morales
Juan D. Luna
Manuel Ramírez
Francisco Vives

EDITORES

Lydia Jiménez-Díaz
Juan de Dios Navarro-López

PRESENTACION

"Pigmaei gigantum humeris impositi plusquam ipsi gigantes vident"

Sir Isaac Newton

En marzo de 2010 se celebró en el Parque de las Ciencias de Granada un encuentro organizado por el Instituto de Neurociencias de la Universidad de Granada, las III Jornadas científicas, que se plasma en este libro que hemos titulado "Encuentros en Neurociencias" vol. I, manifestando así su vocación de continuidad. Esta publicación pretende contribuir a que el foro de intercambio de ideas y conocimientos entre los grupos de investigación de la Universidad de Granada y sus redes de colaboración externa, que son las mencionadas Jornadas, dejen una huella permanente que sirva para que todos los involucrados, y el resto de la comunidad de neurocientíficos españoles, puedan recordar unos y leer otros los trabajos y las ideas que en dicho encuentro se intercambiaron.

Uno de los motivos que nos animó a proponer la edición de este libro fue que, frecuentemente en las reuniones de este tipo, se escuchan propuestas de que los trabajos presentados junto con los esfuerzos hechos en la organización y en la preparación de las presentaciones, deberían tener una repercusión mayor de la que casi siempre tienen.

El presente libro recoge los trabajos presentados durante el Encuentro de forma que ofrece una interesante visión global de algunas de las investigaciones que se llevan a cabo en la Universidad de Granada en el área de la Neurociencia. Esperamos que este sea un libro del que se puedan extraer ideas y que además sirva de inspiración a otros compañeros, para profundizar en esta labor no sólo en esta universidad y en este campo de la ciencia, sino de otras universidades, en otros campos, y también a cualquier persona con curiosidad para seguir aprendiendo.

Queremos agradecer a los organizadores de las Jornadas, a todos los participantes así como al Parque de las Ciencias de Granada su buen hacer, que ha permitido generar el sustrato de este libro. También queremos expresar nuestro agradecimiento especial al director del Instituto de Neurociencias, el Dr. Francisco Vives, y su Junta Directiva por todo el apoyo recibido y la ayuda prestada en el desarrollo de esta iniciativa. Por último nos gustaría transmitir nuestro más sincero agradecimiento a todos los autores de los diferentes capítulos por su entusiasta participación y a nuestros ayudantes de edición J.I. Jimenez y J. Mayordomo por su inestimable colaboración.

Sabemos que el Instituto de Neurociencias "Federico Olóriz" continua su labor formativa organizando las Jornadas anualmente, por lo que esperamos que este libro "Encuentros en Neurociencias" tenga continuidad en el futuro, y que esta pequeña contribución a la difusión y extensión de las ideas y los logros de las personas y grupos que trabajamos con ilusión en estos apasionantes temas, tengan la realimentación que significa el poder compartir, no sólo de palabra, sino también por escrito, ideas, hipótesis y resultados con el resto de grupos. Así todos nos podremos aprovechar de la frase de Sir

Isaac Newton que encabeza esta presentación *“Un enano sobre los hombros de un gigante es capaz de ver más allá que un gigante sólo”*.

Lydia Jiménez Díaz
Juan de Dios Navarro López
Granada, 2011

INDICE

PARTICIPANTES.....	5
PRESENTACION	7
INDICE	9
CONTENIDOS	13
PROLOGO	17
CAPITULO 1. Expresión génica de receptores glutamatérgicos en rodajas de hipocampo de rata. Efecto del péptido β -Amiloide ₍₂₅₋₃₅₎	19
CAPITULO 2. Efectos analgésicos de la administración aguda y repetida de la morfina en ratones silvestres (wild-type) y modificados genéticamente (knockout) para el receptor sigma-1	49
CAPITULO 3. Variabilidad genética en el gen HTR2A y riesgo para depresión	65
CAPITULO 4. La investigación neuropsicológica en el trastorno delirante: una revisión exhaustiva	97
CAPITULO 5. Efectos del envejecimiento en la percepción y atención visual humanos	127
CAPITULO 6. Evaluación neuropsicógica de la enfermedad de Parkinson: alteraciones específicas de la atención	139
CAPITULO 7. En la atención ¿Vale una imagen más que mil palabras?.....	155
CAPITULO 8. Atención visual: influencia de la posición y distractores en estímulos visuales tipo Stroop.....	171
CAPITULO 9. Toma de decisiones en adolescentes con exceso de peso: análisis preliminares	187
CAPITULO 10. PKM ζ y el mantenimiento de la memoria a largo plazo	199
CAPITULO 11. Efectos de sulpiride y metoclopramide sobre los niveles de mRNA de los isoenzimas de la 5 α Reductasa en cerebro de rata.....	213
CAPITULO 12. Estrés oxidativo y protéico en la enfermedad de Huntington.....	229

CONTENIDOS

CAPÍTULO 1

Jennifer Mayordomo Cava, Juan de Dios Navarro López, Lydia Jiménez Díaz

EXPRESION GENICA DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS EN RODAJAS DE HIPOCAMPO DE RATA. EFECTO DEL PEPTIDO β -AMILOIDE₍₂₅₋₃₅₎.

CAPÍTULO 2

Cristina Sánchez Fernández, E.J. Cobos, R. González-Cano, D. Zamanillo, Esperanza Del Pozo

EFECTOS ANALGÉSICOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA Y REPETIDA DE LA MORFINA EN RATONES SILVESTRES (WILD-TYPE) Y MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (KNOCKOUT) PARA EL RECEPTOR SIGMA-1.

CAPÍTULO 3

Esther Molina, Jorge A. Cervilla, Margarita Rivera, Francisco Torres-González, Blanca Gutiérrez

VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL GEN HTR2A Y RIESGO PARA DEPRESIÓN

CAPÍTULO 4

Inmaculada Ibáñez-Casas, Jorge A. Cervilla Ballesteros

LA INVESTIGACIÓN NEUROPSICOLÓGICA EN EL TRASTORNO DELIRANTE: UNA REVISIÓN EXHAUSTIVA

CAPÍTULO 5

José M Rodríguez-Ferrer, Rafael Mancebo-Azor, Raquel Gutiérrez, Miguel A Pugnaire, Luís F Canava

EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO EN LA PERCEPCIÓN Y ATENCIÓN VISUAL HUMANOS

CAPÍTULO 6

Rapela Orta B, Rodríguez Torrecillas EM, Crespo Martín I, Rodríguez Ferrer JM

EVALUACIÓN NEUROPSICOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: ALTERACIONES ESPECÍFICAS DE LA ATENCIÓN.

CAPÍTULO 7

Crespo Martín I, Rapela Orta B, Rodríguez Torrecillas EM, Mancebo Azor R, Rodríguez Ferrer JM

EN LA ATENCIÓN: ¿VALE UNA IMAGEN MÁS QUE MIL PALABRAS?

CAPÍTULO 8

Rodríguez Torrecillas EM, Crespo Martín I, Rapela Orta B, Mancebo Azor R, Rodríguez Ferrer JM

ATENCIÓN VISUAL: INFLUENCIA DE LA POSICIÓN Y DISTRACTORES EN ESTÍMULOS VISUALES TIPO STROOP

CAPÍTULO 9

Elena Delgado-Rico, Natalia Albein Urios, Emilio González Jiménez, Jacqueline Schmidt, Francisco Cruz, Miguel Pérez-García, Cristina Campo, Antonio Verdejo-García

TOMA DE DECISIONES EN ADOLESCENTES CON EXCESO DE PESO: ANÁLISIS PRELIMINARES

CAPÍTULO 10

Fernando Gámiz, Milagros Gallo

PKM ζ Y EL MANTENIMIENTO DE LA MEMORIA A LARGO PLAZO

CAPÍTULO 11

Pilar Sánchez, Jesús M Torres, Beatriz Castro, Esperanza Ortega

EFECTOS DE SULPIRIDE Y METOCLOPRAMIDE SOBRE LOS NIVELES DE MRNA DE LOS ISOENZIMAS DE LA 5A REDUCTASA EN CEREBRO DE RATA

CAPÍTULO 12

Raquel Duran, Francisco J. Barrero, Blas Morales, Juan D. Luna, Manuel Ramírez, Francisco Vives

ESTRÉS OXIDATIVO Y PROTEICO EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

PROLOGO

La mejor semilla que podemos dejar sembrada en el campo de la Neurociencia es la de los nuevos investigadores. Despertar el interés por la investigación, la inquietud por el conocimiento, la sed de aprender, es una labor fundamental de todo profesor. La sociedad necesita más conocimiento, más luz sobre nuestro interior y más medios para vencer los graves problemas de salud que aún hoy padecemos.

En el Instituto de Neurociencias Federico Olóriz continuamente estamos abonando este campo, de acuerdo con nuestras posibilidades, y tenemos una larga trayectoria en investigación y en formación de nuevos científicos. Intentamos crear un caldo de cultivo adecuado buscando financiación para equipar los laboratorios, facilitamos la obtención de becas, luchamos para que los investigadores noveles tengan más facilidades de las que nosotros tuvimos. Las semillas están germinando y creciendo, muchos jóvenes que se iniciaron en nuestros laboratorios son ya profesores investigadores.

En el año 2006, con motivo del 50 aniversario de nuestra fundación, iniciamos la celebración de las Jornadas del Instituto de Neurociencias y gracias al entusiasmo de nuestros miembros, ha habido continuidad en esta tarea. Este libro es el fruto de las III Jornadas, y ya estamos preparando la cuarta. Nuestra fructífera colaboración con el Parque de las Ciencias de Granada y el hacer coincidir nuestras reuniones con la Semana Internacional del Cerebro, nos permite tener una buena proyección social y difundir el avance del conocimiento en nuestro medio. No hay que olvidar que el cerebro es una materia de interés general: acercarnos a saber qué es la mente, cómo pensamos, por qué sentimos o cuales son las bases de nuestra conducta, son parcelas del saber apasionantes y de gran trascendencia para el bienestar de nuestra sociedad.

Finalmente, en nombre del Instituto, quisiera agradecer a Blanca Gutiérrez y Jesús Torres la organización de estas III Jornadas; a Lydia Jiménez y Juan de Dios Navarro la edición de este libro; a los ponentes que han enviado los capítulos, así como a todos los colaboradores, su interés y su apoyo.

Que este árbol que todos estamos cuidando siga creciendo y dando más y mejores frutos.

Francisco Vives Montero
Director del Instituto de Neurociencias "Federico Olóriz"
Universidad de Granada

CAPITULO 1

Expresión génica de receptores glutamatérgicos en rodajas de hipocampo de rata. Efecto del péptido β -Amiloide (25-35).

*J. Mayordomo Cava
J.D. Navarro López
L. Jiménez Díaz*

Expresión génica de receptores glutamatérgicos en rodajas de hipocampo de rata. Efecto del péptido β -Amiloide₍₂₅₋₃₅₎

Jennifer Mayordomo Cava, Juan de Dios Navarro López*, Lydia Jiménez Díaz*

Instituto de Neurociencias F. Oloriz, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada. España

*Los autores han contribuido por igual a este trabajo.

Autores para correspondencia:

Juan D. Navarro, Lydia Jiménez. Dirección actual: Universidad de Castilla La Mancha, Facultad de Medicina de Ciudad Real, área Fisiología, 13071, Ciudad Real.

Direcciones de correo electrónico:

JMC: jennimc@correo.ugr.es

JNL: jdnavarro@ugr.es

LJD: ljd@ugr.es

Resumen

Introducción. Las demencias representan un problema epidemiológico de escala mundial debido al grado de envejecimiento de la población. La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa, crónica y progresiva, que produce alteraciones de la memoria y otros déficits cognitivos. Existen varias hipótesis para explicar los mecanismos subyacentes a los déficits cognitivos y a la neurodegeneración en la EA. Actualmente se cree que el péptido β -amiloide ($A\beta$) es el principal responsable de la cascada de eventos que desencadenan estos procesos.

Objetivo. El objetivo principal de este trabajo es investigar la neurotoxicidad inducida por el $A\beta$ sobre la expresión de receptores glutamatérgicos en el hipocampo de mamíferos. **Métodos.** Los estudios de expresión génica de las distintas subunidades de receptores ionotrópicos glutamatérgicos se realizaron en rodajas de hipocampo de ratas Wistar (30-40 g). La cuantificación de los niveles de expresión génica de las distintas subunidades se llevó a cabo mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. **Resultados.** No se encontró variación significativa de los niveles de RNAm de las subunidades NR2B del receptor NMDA y GluR1 del receptor AMPA por efecto del tiempo, ni tras el tratamiento con $A\beta_{(25-35)}$. Por el contrario, los niveles de RNAm de la subunidad NR2A disminuyeron con el tiempo de incubación y el tratamiento con $A\beta_{(25-35)}$ contrarrestó disminución. **Conclusiones.** Los resultados obtenidos en este estudio muestran la inducción de la expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA en el hipocampo como un nuevo mecanismo de la alteración de la función sináptica mediada por el $A\beta$.

Introducción

Enfermedad de Alzheimer

Las demencias representan un problema epidemiológico de escala mundial debido al grado de envejecimiento de la población. De todos los tipos de demencias descritas hasta la fecha, la enfermedad de Alzheimer (EA) es la más frecuente, representando entre el 50-60% de todos los casos. Según el informe del año 2009 de la Alzheimer's disease International [1], se ha estimado que en 2010 habría 35.6 millones de personas diagnosticadas de demencia, y se prevé que esta cifra se duplicará en 20 años, siendo de 65.7 millones en el año 2030.

La patología de la EA fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer en 1907. En secciones teñidas de cerebro *post mortem* de sus pacientes identificó los dos marcadores de la EA: Placas seniles extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares. Posteriormente, se identificaron los componentes de estas estructuras histológicas determinándose que las placas seniles estaban formadas por la acumulación de péptido β -amiloide ($A\beta$) y los ovillos neurofibrilares por la proteína Tau asociada a microtúbulos. Actualmente, éstos siguen siendo los principales marcadores patológicos *post mortem* de determinación del diagnóstico de EA [5].

La EA es una enfermedad neurodegenerativa, crónica y progresiva, que produce alteraciones de la memoria y otros déficits cognitivos. La edad de aparición heterogénea. Atendiendo a este parámetro la enfermedad se puede clasificar en EA de aparición temprana y de aparición tardía. La EA de aparición temprana es menos frecuente, y se muestra antes de los 60-65 años. Presenta herencia autosómica dominante, y también se le denomina EA familiar. La EA de aparición tardía, se manifiesta después de los 65 años, pero el proceso degenerativo empieza posiblemente 20-30 años antes del inicio clínico de la enfermedad [6]. Esta es la forma más común y es de causa desconocida, aunque posiblemente estén implicados factores genéticos y ambientales [7].

Desde el punto de vista clínico la EA se caracteriza por una serie de alteraciones cognitivas como trastornos en el lenguaje, en la percepción, en la orientación y en la memoria [8]. En los estadios tempranos de la EA las alteraciones en la memoria son sutiles, viéndose afectada la capacidad de recordar pequeños acontecimientos de la vida diaria. Sin embargo, en los estadios finales, los sujetos muestran una incapacidad total y generalmente la muerte es causada por otras enfermedades [9].

Existen varias hipótesis que intentan explicar los mecanismos subyacentes a los déficits cognitivos y a la neurodegeneración en la EA. Actualmente se cree que el péptido $A\beta$ es el principal responsable de la cascada de eventos que desencadenan estos procesos.

Regiones cerebrales afectadas en la Enfermedad de Alzheimer

La EA se caracteriza por anomalías cerebrales que afectan de forma selectiva a regiones específicas, como la neocorteza, el área entorrinal, el hipocampo, el núcleo amigdalino, el núcleo basal, el tálamo anterior y varios núcleos monoaminérgicos del tronco del encéfalo (el locus ceruleus y complejo del rafe).

La distribución y la expansión de esas anomalías siguen patrones característicos, que son específicos de área e incluso de célula. Por ejemplo, en el hipocampo, degeneran neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA2.

Las anomalías en la corteza entorrinal, el hipocampo y otros circuitos de la corteza temporal interna se consideran factores decisivos para la pérdida de la memoria en la EA. No obstante, las alteraciones en la memoria y la falta de atención también podrían estar relacionadas con anomalías en otras áreas como las áreas de asociación de la neocorteza, que se consideran relacionadas con alteraciones de los sistemas colinérgicos del prosencefalo basal [10].

El hipocampo forma parte de lo que se conoce como formación hipocampal, compuesta adicionalmente por el giro dentado y el subículo. A su vez la formación hipocampal, es un componente del sistema límbico y tiene un papel muy relevante en los procesos de memoria declarativa o explícita, así como en la consolidación de la memoria de corto a largo plazo. A continuación se abordarán en profundidad algunas características sobre su conectividad y función (Fig. 1).

El hipocampo está formado por una capa de neuronas piramidales las cuales se comunican entre sí a través de neuronas GABAérgicas (basket cells). Las neuronas piramidales se agrupan en tres regiones denominadas CA3, CA2 y CA1 (Fig. 1). Por otro lado, el giro dentado está formado por neuronas granulares, las cuales reciben la información proveniente de la corteza entorrinal a través de la vía perforante y proyectan hacia la región CA3 del hipocampo por medio de las fibras musgosas. Estas fibras

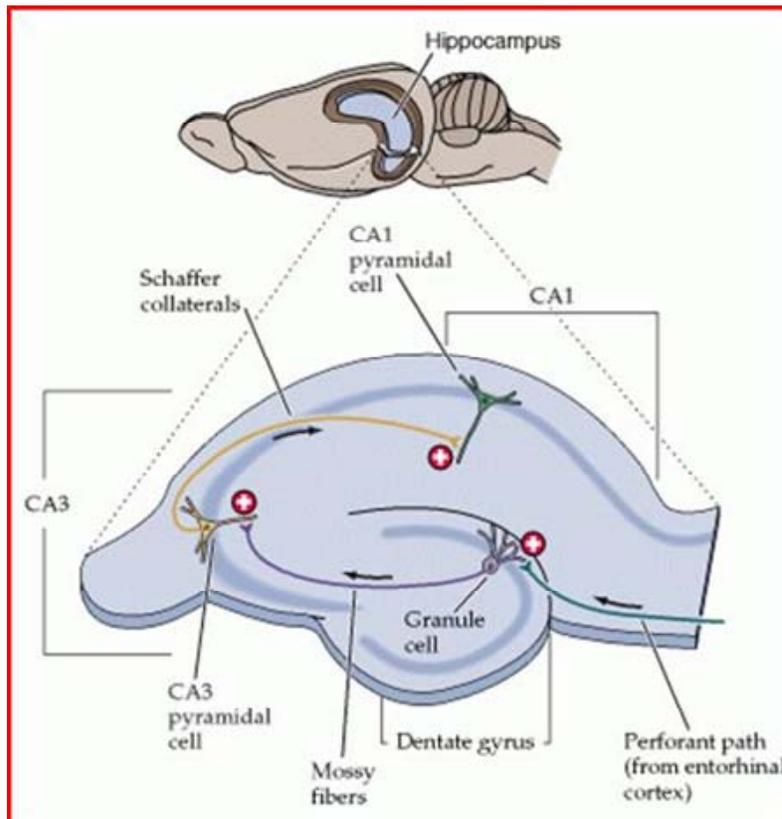


Figura 1. Representación esquemática de una rodaja de hipocampo de roedor. En la parte superior de la figura se indica la localización del hipocampo en el cerebro de roedor. En la parte inferior se señalan las principales regiones vías excitatorias y conexiones sinápticas del hipocampo. (Imagen tomada de [2])

musgosas están formadas por los axones de las células granulares y hacen sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Las neuronas piramidales de la región CA3 proyectan hacia la región CA1 a través de las colaterales de Schaffer y luego desde la región CA1 las neuronas proyectan hacia el subículo [11] y de allí nuevamente a la corteza entorrinal (Fig. 1).

Existen tres vías aferentes principales en el hipocampo que fueron mencionadas anteriormente: la vía perforante que conecta con las células granulares del giro dentado; la fibra musgosa que proyecta a CA3 y finalmente, las colaterales de Schaffer, que proyectan hacia la región CA1 (Fig. 1). La corteza entorrinal, es la principal fuente de proyecciones hacia el hipocampo. Además, el hipocampo recibe algunas proyecciones del núcleo septal [12]. En definitiva, la principal estructura del hipocampo que recibe proyecciones externas es el giro dentado, el cual recibe proyecciones colinérgicas y GABAérgicas desde el septum medial, del área supramamilar, aferencias noradrenérgicas de los núcleos pónicos y locus ceruleus, serotoninérgicas del rafe medial y dopaminérgicas del área tegmental ventral, además de un sistema comisural del hipocampo contralateral [11].

El hipocampo proyecta principalmente a diferentes áreas circunvecinas como la corteza entorrinal, subículo y núcleo septal. Por otro lado, el hipocampo también puede afectar otras estructuras cerebrales mucho más distantes a través de proyecciones indirectas y circuitos complejos. Entre estas estructuras se encuentran el hipotálamo, cuerpos mamilares (vía conexión recíproca del fornix), y el neocortex (vía circuito de papez). Con respecto al neocortex, se ha descrito el efecto del hipocampo sobre estructuras como giro del cíngulo, a través de sus conexiones con corteza entorrinal y subículo [12]. Las conexiones recíprocas del hipocampo con muchas de estas estructuras (incluida la amígdala, corteza prefrontal y de asociación) forma lo que se conoce como sistema límbico, como se ha indicado anteriormente, un sistema importante para los procesos emocionales, entre otras funciones cognitivas.

Neurotransmisión glutamatérgica en el hipocampo

Las neuronas piramidales, las células granulares y sus conexiones intra hipocampales son el mayor componente de lo que se conoce como el circuito trisináptico del hipocampo (Fig. 1). Este circuito se caracteriza por ser unidireccional y glutamatérgico [11]

La estimulación a alta frecuencia de cualquier punto del circuito aferente aumenta los potenciales postsinápticos excitatorios (PEPS) en las neuronas hipocampales. Este incremento en la eficacia sináptica puede permanecer por horas e incluso días. A este proceso se le denomina potenciación a largo plazo (LTP, *long term potentiation*) e implica cambios en receptores postsinápticos, cambios presinápticos (es decir en la liberación del neurotransmisor), cambios estructurales en la sinapsis y cambios en la citoarquitectura de la neurona misma [13]. La LTP es el modelo básico que nos permite entender parte de los procesos funcionales en los circuitos cerebrales que participan en la formación de la memoria. Es un proceso que depende de la actividad de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) y α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), y metabotrópicos. Al activarse estos receptores se induce una ruta de señalización, en la que en última instancia se modifica la expresión génica. Esto genera cambios a nivel neural, como la alteración de la estructura de la neurona postsináptica, aumentando la expresión de receptores e incluso se podrían generar señales, que de manera retrógrada, aumentarían la cantidad de neurotransmisor liberado

por la neurona presináptica. Todo esto, en conjunto, aumenta la eficacia de transmisión sináptica durante largos periodos de tiempo[10]. De esta manera, la función de los receptores de glutamato en los diferentes puntos de circuito del hipocampo, es indispensable para su función sináptica y, por lo tanto, para procesos cognitivos más complejos.

Mecanismos moleculares de la neurodegeneración en la Enfermedad de Alzheimer

La EA es una de las diversas enfermedades neurodegenerativas que presentan un mecanismo patológico común, donde alteraciones conformacionales proteicas conllevan una agregación y acumulación de proteínas en el sistema nervioso central y, como consecuencia, la muerte neuronal [14]. Estos desórdenes conformacionales proteicos con deposición de agregados en el sistema nervioso, son comunes a la EA, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y las encefalopatías espongiiformes transmisibles [15]. La característica general de estos desórdenes es la implicación de proteínas que adoptan plegamientos conformacionales alternativos y estables, ricos en hojas β , que promueven su agregación y acumulación en los tejidos en forma de depósitos fibrilares.

La demencia en la EA está asociada al proceso de neurodegeneración que inicialmente se caracteriza por la pérdida en el número de sinapsis y prosigue con la muerte de neuronas en regiones específicas del cerebro (ver sección 1.2).

Alteración de la función sináptica en los estadios tempranos de la Enfermedad de Alzheimer

La pérdida de sinapsis en el neocórtex y el sistema límbico parece ser el mejor correlato morfológico de los déficits observados en los estadios medios y tardíos de la EA. Sin embargo, muchos pacientes en los estadios tempranos de la enfermedad no muestran un declive significativo en número de sinapsis [16,17]. Por ello, se ha propuesto que un estado de disfunción sináptica, esto es, una alteración de la función sináptica "normal", podría explicar los déficits cognitivos observados en los estadios tempranos de la EA y, de este modo, preceder a la pérdida de sinapsis, la acumulación de placas, la formación de ovillos y la neurodegeneración [18]. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a estos déficits funcionales siguen siendo desconocidos.

Actualmente la hipótesis con mayor relevancia manejada para explicar los déficits cognitivos de la EA es la hipótesis amiloídica o amiloide, donde se postula que la acumulación progresiva de una proteína, el péptido β -amiloide, juega un papel central en la génesis de la EA [5].

Péptido β -amiloide. El A β deriva de la proteína precursora del β -amiloide (APP) que es una proteína transmembrana. Se origina tras realizar dos cortes secuenciales en el dominio transmembrana de la APP por las enzimas proteolíticas β -secretasa, en primer lugar, seguido de γ -secretasa. La longitud del fragmento A β depende del punto de corte de la γ -secretasa en el dominio transmembrana APP, originándose principalmente fragmentos de 38, 40 (A β_{40}) o 42 (A β_{42}) aminoácidos. Para que la γ -secretasa realice su función, es necesaria la presencia de otras cuatro proteínas, formándose un complejo proteico. El

complejo está formado por la presilina (PS1), presilina 2 (PS2), nicastrina, APH1 y PSEN2 (Fig. 2B).

El A β liberado predominante en el plasma sanguíneo y en el líquido cefalorraquídeo es el A β_{40} (~90%) seguido del A β_{42} [19]. A pesar de la mayor presencia del A β_{40} , estudios *in vivo* revelan que el componente principal de las placas amiloides es el A β_{42} , en forma de agregados fibrilares, y se ha propuesto que A β_{42} desempeña un papel fundamental en la formación de las placas. De hecho, modelos de ratones transgénicos que expresan A β_{42} llegan a desarrollar placas amiloides, mientras que los modelos de A β_{40} no las desarrollan [20]. *In vitro*, A β_{42} presenta menor solubilidad y mayor propensión a formar fibrillas, y en cultivos de neuronas se ha visto que es más tóxico que A β_{40} . Las últimas evidencias apuntan a que la toxicidad no viene determinada tanto por los niveles A β_{42} , sino más bien por una alteración de la relación A $\beta_{42/40}$, a favor de la producción de A β_{42} [21,22].

Por otro lado, en el procesamiento no amiloigénico de APP, el primer corte es realizado dentro del dominio transmembrana (el del péptido A β) por la α -secretasa, liberándose un largo dominio de APP soluble, y dejando anclado a la membrana el dominio C-terminal. A este nivel, corta el complejo de la γ -secretasa, liberando al citosol un pequeño dominio C-terminal (Fig. 2A; [23]).

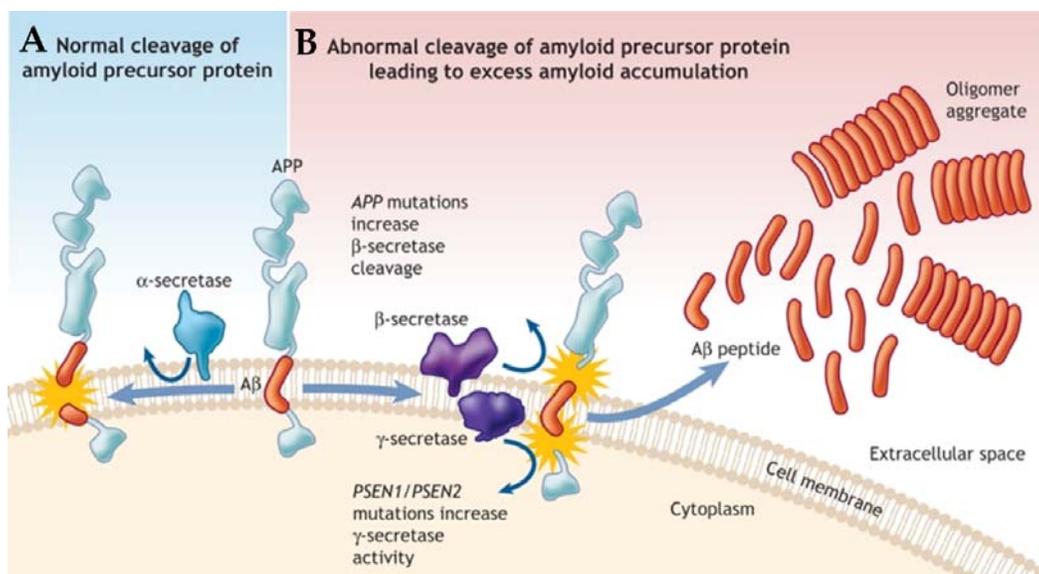


Figura 2. Vías de procesamiento de la proteína precursora amiloide, APP. A. Vía no amiloigénica de proteólisis de APP, llevada a cabo por un primer corte en el dominio transmembrana por la enzima proteolítica α -secretasa, impidiéndose la formación del A β . **B.** Origen del A β por escisión anormal de APP, a partir de dos cortes consecutivos, primero por la β -secretasa y seguidamente por el complejo de la γ -secretasa. Dependiendo del sitio de corte del complejo γ -secretasa, el A β tendrá diferentes tamaños. Las mutaciones en el gen de la APP incrementan la proteólisis de APP por la β -secretasa. Y mutaciones en los genes de las PS1 y PS2 (genes PSEN1 y PSEN2, respectivamente), producen un incremento de la actividad de la γ -secretasa. En ambas situaciones, se produce un aumento en la producción del A β . Cuando el A β se libera al espacio extracelular se agrega formando oligómeros [4].

Oligómeros de β -amiloide. El A β se libera de la membrana celular en forma de monómeros de distintos tamaños, que se agregan y forman oligómeros. A su vez, los oligómeros forman fibrillas de unos 7-10 nm en forma de lámina β , que junto con oligómeros individuales darán lugar a las placas amiloides extracelulares insolubles (Fig. 3; [24]).

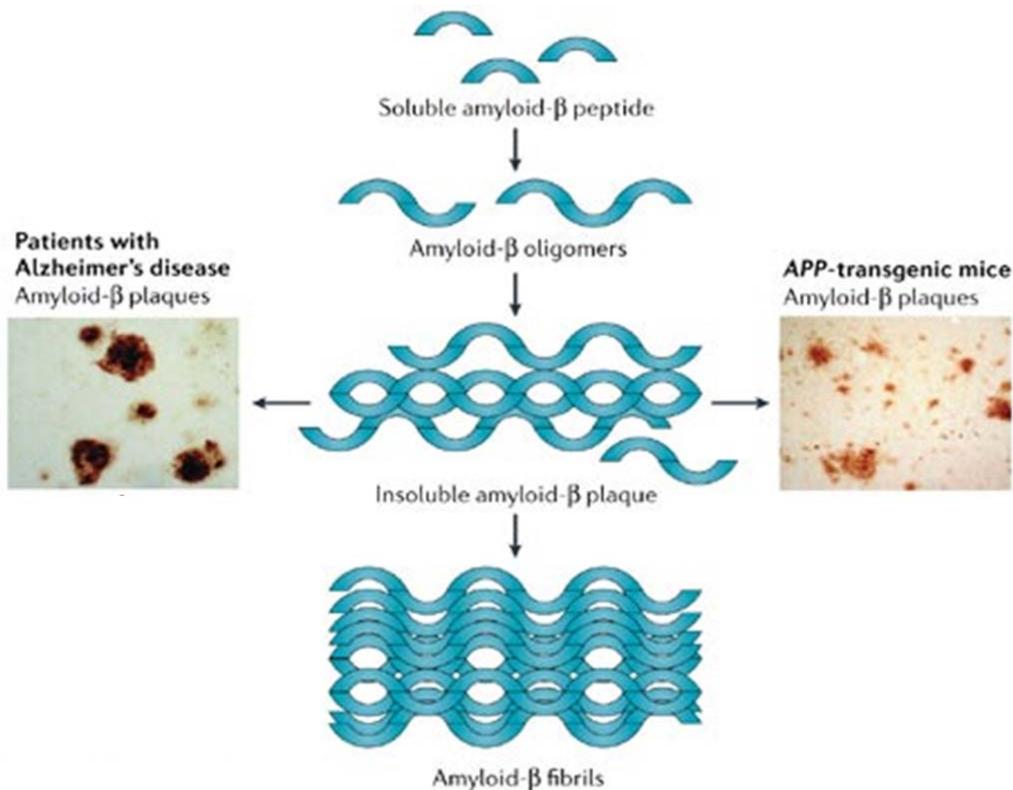


Figura 3. Esquema de la formación de las fibrillas del A β y acumulación en placas en cerebro humano y en ratón transgénico para APP. El A β (monómeros solubles) al polimerizar forman oligómeros de diferentes tamaños. Estos oligómeros se agregan en fibrillas insolubles en forma de lámina β que darán lugar a los depósitos de placas amiloides que se observan en los pacientes con EA (Imagen modificada de [3]).

En los últimos años la hipótesis amiloide formulada inicialmente ha variado. En un principio esta hipótesis establecía que los depósitos de A β eran los desencadenantes de la pérdida de sinápsis y la muerte neuronal, y por tanto de los déficits cognitivos asociados a la EA. Sin embargo en los últimos años se ha modificado debido a que en muchos casos la cantidad de depósitos extracelulares de A β y la severidad de los síntomas asociados a la EA no se correlacionan necesariamente [17]. La actual hipótesis sugiere que las formas solubles, en mayor medida que las conformaciones fibrilares tardías, podrían interferir con el funcionamiento de ciertas redes neuronales, alterando la función sináptica entre células nerviosas [15,25-27]. Los oligómeros y monómeros solubles jugarían un papel fundamental sobre todo en los estadios tempranos de EA [24,28,29], de forma que provocaría la alteración del funcionamiento de los circuitos neuronales llevando a un estado de disfunción sináptica que probablemente comience mucho antes de la aparición de los síntomas clínicos [6].

Además, los depósitos de A β podrían servir de reservorios de los oligómeros solubles tóxicos, que podrían estar dispuestos para ser activados y desensamblados por el contacto con lípidos [30].

Péptido β -amiloide₍₂₅₋₃₅₎: El estudio de las propiedades patofisiológicas del A β puede realizarse a partir de la utilización de análogos sintéticos. El A β ₍₂₅₋₃₅₎ es, entre otros, uno de los análogos utilizados para realizar estos estudios. Es un péptido de 11 aminoácidos, que corresponde a un pequeño fragmento de A β ₍₁₋₄₀₎ y A β ₍₁₋₄₂₎. Representa la región biológicamente activa del A β , y mantiene las mismas propiedades biológicas y físicas, entre ellas la toxicidad, que los monómeros completos A β ₄₀ y A β ₄₂ [31]. Concretamente, se ha visto que la toxicidad del A β ₍₂₅₋₃₅₎ en cultivos de neuronas de hipocampo [32] y en rodajas hipocampales [33] es muy similar a la de A β ₍₁₋₄₀₎ y A β [34].

Neurotoxicidad del β -amiloide

Alteración de la neurotransmisión glutamatérgica. Recientemente se ha mostrado que el A β soluble aislado directamente de cerebros de pacientes con EA induce, potente y consistentemente, varios fenotipos de la EA implicando principalmente a la transmisión sináptica glutamatérgica a través de canales mGluR y NMDA [27]. Por otra parte se ha propuesto que el efecto del A β podría estar mediado por un incremento en la endocitosis del receptor de NMDA [29]. Además, se ha comprobado que la depresión de la transmisión glutamatérgica, mediada por receptores AMPA/Kainato, provocada por el péptido A β está mediada por la modulación de los canales de calcio de tipo L en la amígdala [35]. En cambio, en el septum medial, la depresión inducida por A β de las respuestas excitatorias está mediada tanto por canales de calcio tipo L como por receptores muscarínicos M1 [36].

Además se ha postulado que la toxicidad del A β implique receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR1) interfiriendo en la regulación de la transmisión GABAérgica [37].

Efectos del β -amiloide sobre la función del hipocampo. Como anteriormente se ha comentado, la LTP hace referencia a una forma de plasticidad, en la cual la eficiencia de la transmisión sináptica permanece incrementada a lo largo del tiempo. La LTP fue descrita inicialmente en el hipocampo. Existen evidencias de que diferentes formas solubles del péptido A β , entre ellos el A β ₍₁₋₄₂₎ y sus fragmentos A β ₍₂₅₋₃₅₎ y A β ₍₃₁₋₃₅₎, pueden inhibir la inducción de LTP en el hipocampo de roedores [38]. Este efecto puede ser dependiente de los receptores de glutamato tipo NMDA, entre otros mecanismos [39]. En otros estudios, ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína APP, y por lo tanto tienen incrementados los niveles de A β , presentan deficiencias en tareas de aprendizaje y memoria [40]. Animales transgénicos que producen altos niveles de A β , así como aquellos a los que se les administra A β de manera exógena, presentan deterioro en diferentes tipos de memoria dependientes de la función del hipocampo [41].

Por otro lado, estudios *in vitro* en cultivos de neuronas de hipocampo incubadas con A β , ponen de manifiesto diferentes mecanismos de neurotoxicidad del A β . Entre los mecanismos descritos, mencionar la generación de estrés oxidativo, formación de ovillos neurofibrilares, disfunción mitocondrial, inactivación de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa y la activación de moléculas pro-apoptóticas [42,43].

Otro de los factores que afecta la función del hipocampo antes de los procesos de muerte celular, es la disfunción sináptica. En este sentido el A β afecta considerablemente tanto a la actividad colinérgica, como a la glutamatérgica del hipocampo [42,44].

Hipotesis y objetivos

Se ha propuesto que los déficits cognitivos observados en los estadios tempranos de la EA podrían estar producidos por la presencia de oligómeros y monómeros solubles de A β . Su presencia induciría un estado de disfunción sináptica, previo a la aparición de los síntomas clínicos, que alteraría el funcionamiento de los circuitos neuronales relacionados con el aprendizaje y la memoria.

Nuestra hipótesis de trabajo propone que el mecanismo de acción de las formas solubles del péptido A β podría afectar al patrón de expresión génica de distintos tipos de receptores neuronales implicados en la neurotransmisión glutamatérgica en el hipocampo.

Planteamos, por tanto, como objetivo principal de este trabajo investigar la neurotoxicidad inducida por el A β sobre la expresión de receptores glutamatérgicos en el hipocampo de mamíferos. Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar si los procedimientos de extracción de RNA total a partir de rodajas de hipocampo afectan a la integridad del mismo.
2. Determinar si la fracción soluble del A β , en concreto el fragmento biológicamente activo A β ₍₂₅₋₃₅₎, modifica el patrón de expresión génica de las subunidades de los receptores glutamatérgicos.

El procedimiento experimental que se llevará a cabo para alcanzar estos objetivos será la realización de estudios *in vitro* utilizando muestras de hipocampo de rata incubadas con el péptido A β ₍₂₅₋₃₅₎, y se analizarán distintas subunidades de receptores glutamatérgicos utilizando una técnica de cuantificación de la expresión génica, concretamente la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Resultados

Análisis de la calidad del RNA total

El RNA total fue extraído y purificado de rodajas de hipocampo y se sometió a un tratamiento con DNasa I para maximizar su pureza. Se obtuvieron 44 muestras de RNA total y se analizó la integridad del 91% de las mismas a partir del valor de RQI (calculado a partir de los electroferogramas obtenidos mediante el sistema de electroforesis automatizada *Experion System*, Bio-Rad, EEUU).

Como se ilustra en la Figura 4, un electroferograma muestra el perfil de RNA de degradación de los RNA ribosomales, de acuerdo a la premisa de que con el transcurso del tiempo éstos se van degradando y acumulando como pequeños RNA de bajo peso molecular (aparecen en el electroferograma como picos). En concreto, el RQI se calcula en base a las áreas del electroferograma correspondientes a las regiones 28S, 18S y pre-18S (Fig. 4A,C,E). Para la comparación de las distintas calidades del RNA en las muestras de hipocampo, en la Figura 4 se muestran tres ejemplos de los electroferogramas y las imágenes de los geles *virtuales* correspondientes a tres muestras de RNA total con RQI distintos.

Como se muestra en la Tabla 1 los valores de RQI obtenidos se dividieron en cuatro grupos (definidos según criterio establecido en el laboratorio); RQI menores a 6 (RNA bastante degradado), RQI entre 6 y 7.5 (RNA algo degradado), RQI entre 7.5 y 8.5 (RNA de buena calidad) y RQI mayores a 8.5 (RNA de excelente calidad). El 50 % de las muestras de RNA total tuvieron un RQI mayor a 8.5 (Tabla 1).

Al comparar la integridad del RNA de las rodajas de hipocampo sin tratamiento con el de las rodajas de hipocampo incubadas con $A\beta_{(25-35)}$ no se encontraron diferencias significativas ($p=0.989$) Tampoco se hallaron diferencias en la integridad del RNA atendiendo el tiempo de incubación ($p=0.798$; $F_{(4,35)}=0.413$).

Finalmente, el criterio para la selección de las muestras de RNA a utilizar para la síntesis de cDNA y análisis de la expresión génica fue un valor de RQI igual o mayor a 7.00. Se incluyeron 20 muestras ($n=20$) de 4 animales diferentes. De estas 20 muestras, el 65% tenían un valor de RQI mayor a 8, es decir, un RNA de muy buena calidad.

Tabla 1. Índice de la calidad del RNA total extraído (RQI) de rodajas de hipocampo y porcentaje de muestras que hay en los rangos de RQI propuestos.

RQI	% de muestras
RQI < 6	2.5
6 < RQI < 7.5	15
7.5 < RQI < 8.5	32.5
8.5 < RQI < 10	50

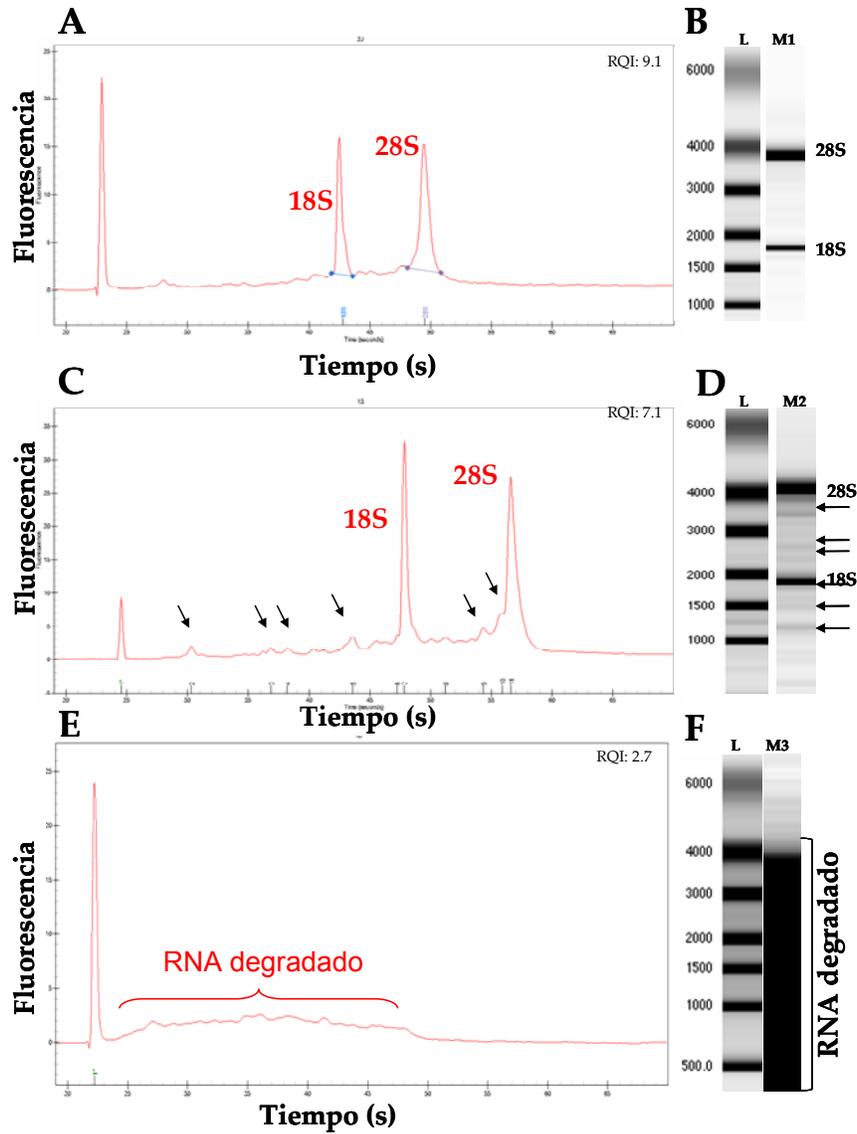


Figura 4. Medida de la calidad del RNA total extraído de rodajas de hipocampo. A, C y E muestran los electroferogramas, donde se representa la fluorescencia con respecto al tiempo (s) de reacción, correspondientes a los perfiles de RNA total de muestras de hipocampo. El primer pico que aparece en los 3 perfiles corresponde al marcador de peso molecular. B, D y F representan las imágenes de los gels virtuales de cada muestra. Se representa el marcador de peso molecular en el carril izquierdo y la muestra de RNA en el carril derecho. A. Perfil de RNA con un RQI de 9.1. Los picos corresponden a las subunidades ribosomales 18S y 28S. En este caso, no se observan en el perfil pequeños picos que muestren degradación del RNA. B. Hay dos bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S, respectivamente. El mayor grosor de la banda correspondiente a 28S indica mayor concentración con respecto al 18S. C. Perfil de RNA con un RQI de 7.1. Se indican con flechas los diferentes picos correspondientes a fragmentos degradados de RNA, que atendiendo al tamaño, aparecen en diferentes momentos a lo largo del tiempo. D. En la muestra se señalan con flechas los fragmentos degradados de diferentes tamaños. E. Perfil de RNA con RQI de 2.1. Se observa una curva correspondiente a RNA muy degradado. F. Es indistinguible cualquier tipo de banda. **18S y 28S:** Subunidades ribosomales 18S y 28S, respectivamente; **L:** Marcador de peso molecular; **M1, M2 y M3:** Tres muestras de RNA total de hipocampo distintas.

Cuantificación relativa de la expresión génica de subunidades de receptores glutamatérgicos mediante qPCR

Para determinar si el $A\beta_{(25-35)}$ induce cambios en la expresión génica en rodajas de hipocampo de rata, se cuantificó el RNAm de diferentes subunidades de receptores glutamatérgicos mediante la técnica de qPCR.

Optimización de las qPCRs. Selección de cebadores

Como se indica detalladamente en la sección de Material y Métodos, se calculó la eficiencia (E) de amplificación para cada pareja de cebadores en nuestras muestras de hipocampo. Para ello, se realizaron curvas estándar a partir de diluciones seriadas del cDNA. La E se calcula a partir de la pendiente de la recta de regresión resultante. En la Tabla 2 se recogen las E obtenidas (expresadas en porcentaje) cuyos valores variaron entre 99.2 – 116.6 % en función del cebador evaluado. También a partir de las curvas estándar se calculó el valor del coeficiente de determinación (R^2 , Tabla 2), que nos indica el ajuste de los datos a la recta de regresión.

Tabla 2. Concentraciones de los cebadores sentido y antisentido utilizados para cada gen y los R^2 y E (%) obtenidos en las qPCR de las curvas estándar.

Gen	R^2	E (%)	Optimización
β -Actina	0,998	99,4	✓
GAPDH	--	--	X
18S	1	103,2	✓
NR1	0,996	110,2	✓
NR2A	0,991	99,2	✓
NR2B	0,997	109,6	✓
GluR1	0,996	116,6	✓
GluR2	--	--	X
M1	0,988	103,4	✓

Negro: genes de referencia; **Azul:** subunidades del receptor NMDA; **Verde:** subunidades del receptor AMPA; **Marrón:** receptor colinérgico muscarínico; R^2 : coeficiente de determinación; **E (%):** eficiencia de amplificación; **✓:** qPCR optimizada; **X:** qPCR sin optimizar.

Junto con la reproducibilidad de los replicados medidos, un valor de R^2 mayor a 0.980 y una E entre 90 – 105%, son los indicadores de una qPCR optimizada. Como se observa en la Tabla 4 los cebadores para los genes que codifican para las subunidades de receptores GluR1, NR2A, NR2B, NR1, el receptor muscarínico M1, los genes de referencia β -Actina y subunidad ribosomal 18S, funcionaron de forma óptima. Sin embargo, los cebadores para los genes GAPDH y GluR2, no produjeron una amplificación adecuada.

Una vez determinadas las eficiencias de amplificación de los cebadores, en el presente estudio de expresión génica de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos, se seleccionaron los genes que codifican para las subunidades NR2A, NR2B y GluR1 para el desarrollo de las qPCR. Como gen de referencia se seleccionó el gen de la β -Actina.

Cuantificación relativa de la expresión de subunidades de receptores glutamatérgicos ionotrópicos

La cuantificación relativa de la expresión génica se llevó a cabo a partir de la normalización de los niveles de expresión de las distintas subunidades con la expresión del gen de la β -Actina (la expresión génica de este gen de referencia no se ve afectada ni por el tiempo de incubación, ni el tratamiento con $A\beta$; $p=0.646$; $F_{(4,15)}=0.634$).

En la figura 5 se muestra la expresión relativa (en valores de porcentaje) de las subunidades NR2A, NR2B y GluR1 (Fig. 5A,B,C), tanto en condiciones control como en presencia $A\beta_{(25-35)}$ a los distintos tiempos de incubación.

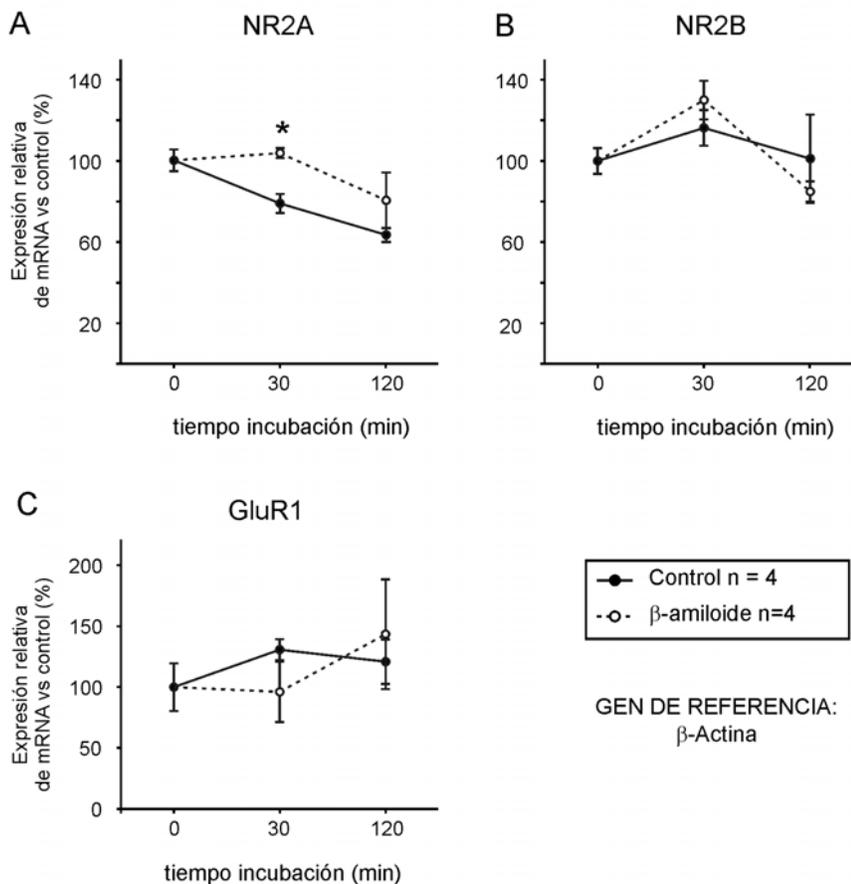


Figura 5. Porcentaje de expresión relativa de receptores glutamatérgicos: subunidades NR2A, NR2B y GluR1 en rodajas de hipocampo de rata. La expresión relativa se ha normalizado con la expresión constitutiva del gen de referencia β -Actina. En todos los casos se representa la cuantificación relativa en % de la expresión génica en condiciones control y con $A\beta_{(25-35)}$, en función del tiempo (min). En todos los casos, en tiempo cero se considera 100% de expresión génica. *, $p < 0.05$. **A.** Expresión génica de la subunidad NR2A. **B.** Expresión génica de la subunidad NR2B. **C.** Expresión génica de la subunidad GluR1.

No se encontró variación significativa de los niveles de RNAm de las subunidades NR2B y GluR1 por efecto del tiempo, ni tras el tratamiento con $A\beta_{(25-35)}$ (Fig. 5B-C; NR2B, $p=0.061$, $F_{(4,15)}=3.388$; GluR1, $p=0.573$, $F_{(4,15)}=0.578$).

Por el contrario, los niveles de RNAm de la subunidad NR2A disminuyeron con el tiempo de incubación (Fig. 5A; $p=0.001$, $F_{(2,9)}=16.329$) reduciéndose en un 20% en

condiciones control y un 35% a los 120 min. El tratamiento con $A\beta_{(25-35)}$ evitó esta disminución a los 30 min (Fig. 5A, $p=0.021$), es decir, $A\beta_{(25-35)}$ aumentó la cantidad de RNAm de la subunidad NR2A tras 30 min de incubación. Este efecto no se mantuvo a los 120 min.

Discusión

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un análisis del efecto del $A\beta_{(25-35)}$ sobre la expresión génica de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA y la subunidad GluR1 del receptor AMPA, en rodajas de hipocampo de rata.

Efecto del β -amiloide en la integridad del RNAm

A partir del análisis de la calidad del RNA en el presente trabajo se ha determinado que el tratamiento con $A\beta_{(25-35)}$ 1 μ M en rodajas de hipocampo de rata no afecta a la integridad del mismo, indicando que se trata de un modelo adecuado para el estudio de la variación de los niveles de RNAm inducida por el péptido.

Efecto del β -amiloide sobre la expresión génica de receptores ionotrópicos de glutamato.

Aunque existe bastante controversia sobre los mecanismos que emplea el $A\beta$ para producir la alteración de la neurotransmisión glutamatérgica, se encuentra ampliamente aceptado que se modifican las funciones de los receptores de NMDA y AMPA [44,45]. En el presente trabajo se ha analizado si esta alteración podría estar mediada por un cambio en la expresión de las subunidades que conforman estos receptores.

Expresión de subunidades de receptores AMPA

Los receptores AMPA están formados por cuatro subunidades (GluR1-4). La unidad funcional es un tetrámero. La activación del receptor AMPA esta mediada únicamente por glutamato. Las propiedades del receptor dependen de las subunidades GluR1, GluR3 y GluR4, mientras que la subunidad GluR2 le confiere impermeabilidad al calcio [46].

En el presente estudio no se han hallado diferencias en los niveles de RNAm del gen de GluR1 provocadas por $A\beta_{(25-35)}$. Estos resultados estarían de acuerdo con otros autores que tampoco encuentran diferencias en la expresión génica de GluR1 y GluR2, ni en el giro dentado, ni en el hipocampo, de cerebros de enfermos de Alzheimer en estadios tempranos, moderados y severos [47]. Sin embargo, se ha sugerido que existe una disminución del RNAm de GluR1 en el giro dentado, pero no en el hipocampo en cerebros de pacientes de EA avanzado [48]. En nuestro estudio, dado que se han utilizado rodajas de hipocampo completo, no podemos descartar que el $A\beta$ tenga efectos específicos para cada región de la estructura hipocámpica.

Expresión de subunidades de receptores NMDA

El receptor NMDA es un complejo proteico compuesto por subunidades NR1, NR2 (A, B, C o D) y NR3 (A, B), en diferentes combinaciones. La conformación mayoritaria es un

tetrámero formado por dos dímeros, uno de NR1 y otro de NR2. Su expresión varía tanto en el tiempo como en el área cerebral. En las primeras etapas del desarrollo predomina la expresión de NR2B y NR2D mientras que en cerebro adulto predomina la expresión de NR2A y NR2C [49]. Las subunidades NR1 y NR2A se expresan ampliamente por todo el cerebro, mientras que NR2B se expresa de manera mayoritaria en el cerebro anterior, y co-localiza con NR2A en la corteza cerebral, hipocampo y núcleo estriado. La subunidad NR2C se localiza mayoritariamente en cerebelo, tálamo y bulbo olfatorio [50]. La diferente composición de subtipos de NR2 confiere a los receptores de NMDA características fisiológicas y farmacológicas específicas, incluyendo sensibilidad al Zn^{+2} , H^+ y poliaminas, apertura del canal e interacciones con proteínas intracelulares de señalización celular. La activación de los receptores de NMDA requiere la unión simultánea de dos co-agonistas, el glutamato y la glicina. La glicina se une a las subunidades NR1 y NR3, mientras que el glutamato se une a NR2 [49,51]. Se han estudiado las posibles funciones de las distintas subunidades, principalmente de las subunidades NR2A y NR2B, y los resultados obtenidos son diversos. En rodajas de hipocampo de rata se ha visto que la subunidad NR2A tiene un papel fundamental en la plasticidad y en la mediación de la respuesta de los receptores NMDA, en concreto en la LTP [52]. No obstante, otros estudios consideran que en este tipo de respuesta estarían implicadas más subunidades [53].

En el presente análisis de los niveles de RNAm de subunidades del receptor NMDA en hipocampo de rata tras la exposición al $A\beta_{(25-35)}$, hemos encontrado que la expresión génica de NR2B no varió, mientras que la expresión génica de NR2A sí se vio afectada. En concreto, la expresión del NR2A aumentó por efecto del $A\beta$. Este resultado podría explicar la aparición del estado de disfunción sináptica en el hipocampo que se postula para explicar los efectos del $A\beta$ en los estadios tempranos de la EA. La alteración crónica de esta subunidad induciría un desbalance funcional en la LTP, lo que podría a su vez subyacer a los déficits cognitivos observados en las etapas iniciales de la EA [18]. Además se ha visto que una LTP alterada por una sobreactivación de los canales NMDA puede ser reestablecida usando un bloqueante específico de los mismos, la memantina, a concentraciones terapéuticamente relevantes que mejoran los síntomas y ralentizan la progresión de la EA en pacientes [54].

Otros autores, sin embargo, han determinado una disminución en la cantidad de RNAm de NR2B, pero no en NR2A en las etapas tempranas de la EA [55]. Por otro lado, también se han encontrado diferencias de acuerdo a las áreas estudiadas, observándose una disminución tanto en los niveles de NR2A como en los de NR2B en el hipocampo de cerebros *post mortem* [34]. Por el contrario, otros estudios no encuentran variaciones en los niveles de RNAm de NR1, NR2B y NR2A entre hipocampos de pacientes de EA en estadios moderados y severos [55]. Además, en otras aproximaciones experimentales (por ejemplo, tras la inducción de isquemia cerebral) se han encontrado diferencias entre los niveles de expresión génica de las subunidades dentro de las distintas regiones del hipocampo [56].

Consideraciones finales y perspectivas futuras

Como se ha descrito anteriormente existen resultados diversos, y en ocasiones opuestos, del efecto del $A\beta$ sobre la expresión génica de subunidades de receptores glutamatérgicos. Esta diversidad puede deberse a las diferencias entre los distintos procedimientos experimentales utilizados. Algunos factores a tener en cuenta son el tipo de estudio a realizar, por ejemplo, la utilización de cultivos celulares, tejido cerebral

animal o humano, rodajas completas o secciones concretas del tejido, etc. También puede contribuir a esta alta variabilidad el tipo de A β utilizado (A β_{40} , A β_{42} , A β_{25-35}), si éstos son sintéticos o naturales, el estado de oligomerización, la concentración y el tiempo de incubación, entre otros.

En el presente trabajo se han utilizado rodajas de hipocampo incubadas con A $\beta_{(25-35)}$ 1 μ M. Esta decisión se tomó en base a estudios similares, en los que, utilizando dicha concentración, se observaron los efectos tóxicos del A β [26,35]. Sin embargo, otros autores [57] generan los efectos tóxicos del A β a concentraciones más altas que en nuestro estudio que podrían haber tenido efectos adicionales sobre la expresión génica en el hipocampo.

Otro factor influyente puede ser la utilización del hipocampo completo, en lugar de secciones de sus regiones. Como han visto otros autores, pueden existir variaciones específicas en los niveles de RNAm de las regiones CA1 y CA3 [58]. Así, al utilizar el hipocampo completo se pueden haber "diluido" algunas variaciones en los niveles de expresión. Por otro lado, el tiempo mínimo de incubación de las rodajas de hipocampo con A β en este trabajo fue de 30 min, dado que en estudios previos electrofisiológicos realizados en el laboratorio los efectos tóxicos del A β no aparecen antes de los 20 min (Navarro-López JD, Comunicación personal).

Finalmente cabe resaltar que además de los efectos del A β sobre la función sináptica en los sistemas de neurotransmisión glutamatérgica a través de receptores ionotrópicos de NMDA [29,59] y AMPA [35] podrían estar implicados otros tipos de receptores o canales. Entre ellos, receptores de glutamato metabotrópicos [37], receptores muscarínicos M1 [57,60], canales de potasio, y/o la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa [61].

Tras la realización de este trabajo, y de acuerdo con los resultados obtenidos, nos proponemos desarrollar con mayor amplitud los siguientes aspectos.

En primer lugar, dada la heterogeneidad de resultados en el campo de estudio, pretendemos incorporar a futuros experimentos los péptidos A $\beta_{(1-42)}$ y A $\beta_{(1-40)}$. Además, está previsto incorporar el A β de secuencia inversa, A $\beta_{(35-25)}$, como control negativo de los experimentos. Con esto pretendemos controlar esta variable y descartar algunos resultados existentes en la bibliografía, corroborando los obtenidos con A $\beta_{(25-35)}$.

En segundo lugar consideramos que mediante el análisis del RNAm obtenemos una valiosa visión global de la situación del sistema pero no nos ofrece información sobre la expresión de la proteína para la que codifica ese RNAm, la funcionalidad del receptor o la propia neurotransmisión. En este sentido, prevemos realizar un abordaje multidisciplinar en el que, junto con los estudios de expresión génica de las subunidades de los distintos receptores, diseñaremos estudios electrofisiológicos, que aporten datos de la funcionalidad de los receptores y su participación en la neurotransmisión hipocámpica; así como estudios inmunohistoquímicos y de *Western blot* que nos proporcionen información sobre la localización de los receptores.

Conclusiones

Existen cada vez más evidencias que sugieren que en los estadios tempranos de la EA se produce una desregulación de los receptores de glutamato, tanto ionotrópicos como metabotrópicos, producida por el A β . Esta situación puede llevar a un estado de disfunción

en la transmisión sináptica glutamatérgica que explicaría los déficits cognitivos tempranos observados en el inicio de la enfermedad. Los resultados obtenidos en este estudio muestran la inducción de la expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA en el hipocampo como un nuevo mecanismo de la alteración de la función sináptica mediada por el A β .

Métodos

Obtención de muestras de tejido nervioso hipocampal

Animales. Los estudios de expresión génica de las distintas subunidades de receptores ionotrópicos glutamatérgicos se realizaron en rodajas de hipocampo de ratas Wistar de 30-40 gramos (3-5 semanas), de ambos sexos. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices españolas (BOE 67/8509-12, 1988) y la regulación de la Unión Europea (86/609/UE) para el uso de animales de laboratorio.

Aislamiento del cerebro. Los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se procedió a la extracción de cerebro. Durante todo el procedimiento, y con la finalidad de preservar en condiciones óptimas el tejido, el cerebro se mantuvo constantemente húmedo y frío (entre 2-4°C) mediante la aplicación con una pipeta Pasteur gota a gota, de solución de Krebs modificada (ver Tabla 3) burbujeada con gas carbógeno (95% O₂; 5% CO₂).

Una vez se extrajo el encéfalo, se seccionó el nervio óptico y el tallo cerebral, y se sumergió en solución de Krebs modificada (2-4°C), también burbujeada con gas carbógeno. Transcurrido ese tiempo, se procedió al tallado y a la obtención de rodajas de hipocampo de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson[62].

Para la realización de los experimentos se emplearon dos tipos de soluciones de Krebs. Desde la decapitación del animal hasta la obtención de las rodajas se utilizó una solución de Krebs modificada. Para la incubación se utilizó la solución de Krebs normal (Tabla 3).

En todo momento, las soluciones se burbujearon con gas carbógeno con el fin de mantener adecuados el aporte de oxígeno y el pH de las mismas (pH ≈ 7.2). Todos los productos utilizados en la elaboración de las soluciones fueron de la marca comercial Sigma (Reino Unido).

Tabla 3. Composición de las soluciones de Krebs empleadas en la obtención e incubación de las rodajas.

	Krebs Normal (mM) pH = 7.1 – 7.3	Krebs Modificado (mM) pH = 7.1 – 7.3
NaCl	119.00	
KCl	2.50	2.50
CaCl ₂	2.50	2.50
MgCl ₂	1.50	1.50
NaH ₂ PO ₄	1.25	1.25
Glucosa	11.00	11,00
NaHCO ₃	25.00	25.00
Sacarosa		205.00

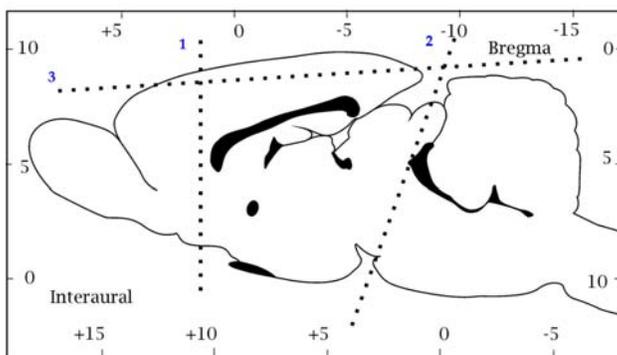


Figura 6. Representación esquemática del cerebro de rata. Las líneas discontinuas numeradas indican el orden y el lugar de tallado del cerebro. (Imagen modificada del Atlas de Paxinos y Watson, 2007).

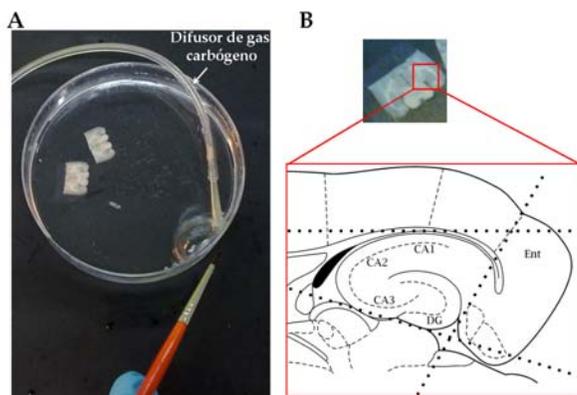


Figura 7. Tallado de las rodajas de cerebro para preincubación. A. Almacenaje de las rodajas de cerebro en una placa de Petri con solución de Krebs modificada fría, burbujeada con gas carbógeno. B. Tallado de la rodaja de cerebro mediante la realización de tres cortes (líneas negras punteadas), delimitando así el hipocampo para su posterior preincubación en Krebs normal.

La disminución de la concentración de Na^+ en la solución de Krebs modificada, tuvo como finalidad minimizar la entrada del mismo al interior celular y, por tanto, la despolarización de las neuronas, sobre todo durante la obtención de los cortes. Por otra parte, la sustitución de NaCl por sacarosa a una concentración de 205 mM tuvo como objetivo conservar la osmolaridad total de la solución.

Obtención de las rodajas de hipocampo. Tras el aislamiento de cerebro, rápidamente se realizó el tallado de la pieza. Para ello, el cerebro se situó sobre una placa de Petri agregando continuamente solución de Krebs modificada burbujeada con carbógeno, como se ha descrito anteriormente. Con una cuchilla se realizó un primer corte perpendicular a la línea antero-posterior del cerebro, a nivel del quiasma óptico seguido de un segundo corte, paralelo al anterior, a nivel del colículo inferior. El bloque se apoyó por la parte anterior y se realizó un tercer corte paralelo a la línea antero-posterior, del 10-20% del volumen total de la parte más dorsal del cerebro (Fig. 6). El bloque final obtenido se fijó con cianoacrilato (Ceys SA, España) sobre una base de aluminio por la parte dorsal, quedando la parte anterior cortical orientada hacia la cuchilla del vibratomo. Se obtiene de esta forma

el llamado “corte mágico” del hipocampo [63] conservando en unas condiciones óptimas los circuitos hipocampales en la rodaja.

La pieza se rodeó con bloques de agar al 2 % de unos 5 mm aproximadamente de espesor y de su misma altura. Los bloques de agar sirvieron para que durante el corte de la pieza no se desplazara el tejido nervioso. A continuación utilizando el vibratomo se realizaron cortes horizontales de 300-350 μm de espesor conteniendo el hipocampo en ambos hemisferios. De cada cerebro tallado se obtuvieron 10-14 muestras de hemisferio cerebral conteniendo las secciones de hipocampo. Los cortes se recogieron en una placa de Petri y se mantuvieron en solución de Krebs modificada entre 3-4°C, burbujeada con carbógeno (Fig. 7A).

Preincubación. Una vez obtenidas, las rodajas se tallaron manualmente para diseccionar el hipocampo. El hipocampo se delimitó cortando y desechando el tejido circundante (Fig. 7B). Una vez se delimitaron las rodajas de hipocampo, se recogieron y se preincubaron, durante al menos diez minutos desde la disección de la última rodaja, en una placa de Petri con solución de Krebs normal burbujeada con gas carbógeno a Tª ambiente.

Incubación de las rodajas con el péptido A β ₍₂₅₋₃₅₎.

La rodajas se incubaron en condiciones control (en solución de Krebs normal) y en presencia de A β ₍₂₅₋₃₅₎ 1 μ M (Tocris, Reino Unido). En ambos casos, las incubaciones se realizaron a distintos tiempos (0, 30 y 120 min; Fig. 8).

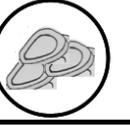
		TIEMPO DE INCUBACIÓN (min)		
		0	30	120
TRATAMIENTO	CONTROL			
	A β ₍₂₅₋₃₅₎	X		

Figura 8. Representación esquemática del procedimiento de incubación de las rodajas de hipocampo. El tratamiento control corresponde a la incubación en solución de Krebs normal. El tratamiento A β ₍₂₅₋₃₅₎ corresponde a la incubación con solución de Krebs normal con A β ₍₂₅₋₃₅₎ 1 μ M. Las rodajas se incubaron durante 30 ó 120 min. En tiempo cero las rodajas de hipocampo no tuvieron tratamiento.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR).

La cuantificación de los niveles de expresión génica de subunidades de receptores glutamatérgicos se llevó a cabo mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real.

Extracción y purificación del RNA total. La extracción y aislamiento del RNA total de las rodajas de hipocampo se llevó cabo usando Trizol (Invitrogen, Reino Unido) y columnas de homogeneización *Qiasredder* (Qiagen, Alemania). Seguidamente, se realizó la purificación del RNA total con el Kit de purificación por columna *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Alemania).

Además, se llevó a cabo un tratamiento adicional con DNasa I (Qiagen, Alemania), para eliminar la posible contaminación por DNA y maximizar la pureza del RNA.

Tras la obtención del RNA total de cada rodaja se procedió a la cuantificación del mismo, midiendo en un espectrofotómetro para pequeños volúmenes a 260 nm (Nanodrop 2000c, ThermoScientific, EEUU), obteniendo los datos de la concentración del RNA total de cada muestra (en ng/ μ l). A continuación se analizó la calidad del RNA, en base a la pureza e integridad del RNA obtenido, utilizando el sistema de análisis de calidad por electroforesis automatizada *Experion System* (Bio-Rad, EEUU). Este procedimiento fue realizado por la Unidad de Genómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (IPBLN,

Granada). La integridad y la pureza del RNA vienen indicadas por el índice RQI (*RNA Quality Indicador*) que es un dato numérico entre 10 (RNA intacto) y 1 (RNA altamente degradado).

Síntesis de cDNA a partir del RNA total. La síntesis de cDNA se realizó mediante la técnica de retrotranscripción en dos etapas. En la primera etapa, se agregaron cantidades iguales de 0.198 μ g de RNA total, *random nonamers* 2 μ M (Sigma, Reino Unido), *oligo dT₂₀* 1 μ M (Promega, EEUU) y dNTPmix (mezcla de los cuatro dNTPs) 0.5 μ M, (Promega, EEUU) en un volumen final de 13 μ l, y se mantuvieron en el termociclador (T-profesional, Biometra, Alemania) durante 5 min a 65°C. Seguidamente se depositaron las muestras en hielo durante 5 min. En la segunda etapa se llevó a cabo la retrotranscripción añadiendo a la mezcla anterior *Buffer First-Strand 5X* (Invitrogen, Reino Unido), *DTT* 0.1 M Inhibidor de ribonucleasa 40 unidades/ μ l (Promega, EEUU) y *Superscript TM III RT* (Invitrogen, Reino Unido) en un volumen final de 20 μ l. Las condiciones que se siguieron en el termociclador fueron de 25°C durante 5 min, 50°C durante 50 min y 70°C durante 15 min.

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados.

Gen	Secuencias cebadores (5'→3')
β-Actina	S AGCCATGTACGTAGCCATCC
	A ACCCTCATAGATGGGCACAG
GAPDH	S GGGCAGCCCAGAACATCA
	A TGCCGTATGGCTTCATTGATG
18S	S CTTAGAGGGACAAGTGGCG
	A GGACATCTAAGGGCATCACA
NR1	S CAGCCGTGAACGTGTGGAG
	A TGCTCTACCACTCTTCTATCC
NR2A	S CAGTGATGTGTATATTTTCAGAGCATGTTA
	A ACACTCGTCTATTGCTGCAGGAA
NR2B	S TCCGTCTTTCTTATGTGGATATGC
	A CCTTAGGGCGGACAGATTAAGG
GluR1	S TTCTGCACCGTTTTCTAGG
	A CGCATGTTCTGTGATTGTT
GluR2	S TTCTGCACCGTTTTCTAGG
	A CGCATGTTCTGTGATTGTT
M1	S GACCTCATCATTGGCACCTT
	A GGTCAAAGCTGATGAGCAGA

Negro: Genes de referencia; **Azul:** Subunidades del receptor NMDA; **Verde:** Subunidades del receptor AMPA; **Marrón:** receptor colinérgico muscarínico. S: sentido; A: antisentido

PCR cuantitativa en tiempo real. Las qPCR (PCRs cuantitativas) se realizaron con el equipo AB7500 (Applied Biosystems, EEUU) utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EEUU) para cada par de cebadores específicos (ver secuencias en Tabla 4) para cada gen estudiado (por ejemplo, genes que codifican para las subunidades de receptores ionotrópicos de glutamato o los genes de referencia) Se incluyeron siempre muestras de cDNA control (obtenidas sin transcriptasa) y muestras sin cDNA.

Las eficiencias (E) de amplificación de las PCRs se calcularon para cada gen a partir de curvas estándar obtenidas mediante diluciones seriadas. Las reacciones se realizaron por triplicado para 4 replicados biológicos (4 animales) y la expresión de cada gen se normalizó a la expresión del gen de referencia β -Actina. Los cambios en los niveles de expresión génica se cuantificaron de acuerdo a [64], considerando los valores de CT (*cycle threshold*) y las E de las PCRs para los genes diana y de referencia. El ratio de la expresión relativa de los genes diana respecto al gen de referencia se calculó por medio de la fórmula: $\text{ratio} = E_{\text{diana}}^{\Delta\text{CTdiana}(\text{control-tratado})} / E_{\text{ref}}^{\Delta\text{CTref}(\text{control-tratado})}$. La especificidad de los productos de la PCR se determinó por análisis de las curvas de disociación. Las secuencias de los cebadores se diseñaron a partir de bases de datos de secuencias (NCBI) usando el servicio Sigma Genosys Probe Design (Sigma, Reino Unido) o a partir de secuencias previamente publicadas.

Análisis estadístico de los datos

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa SPSS v12 para *Windows*. Para la comparación tanto de los valores de RQI como de los ratios de expresión génica se aplicaron las pruebas paramétricas apropiadas (*t* de *Student* o ANOVA de una o dos vías seguido del análisis *post hoc* adecuado). Si los datos no siguieron una distribución normal se usaron las pruebas no paramétricas equivalentes.

Contribución de los Autores

JD Navarro y L Jiménez diseñaron el estudio. JMC y JDNL obtuvieron las muestras de tejido nervioso hipocampal y las trataron con β -amiloide. JMC y LJD realizaron y analizaron los experimentos de expresión génica. JMC, JDNL y LJD han elaborado el presente manuscrito; JDNL y LJD lo han revisado.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación BFU2009-07341 y SAF2010-14878. JMC fue parcialmente financiada por la Red de Terapia Celular de la Junta de Castilla y León. JDNL disfruta de un Contrato Ramón y Cajal (RYC-2009-03827). LJD fue parcialmente financiada por un contrato Juan de la Cierva. Agradecemos profundamente al Dr. Francisco Vives y al Dr. Agatángelo Soler del Dpto. de Fisiología de la Universidad de Granada, que brindaran desinteresadamente sus laboratorios en el Centro de Investigación Biomédica para la realización de este trabajo; al Dr. Javier Yajeya de la Universidad de Salamanca por su apoyo incondicional y, por último, al Dr. Juan Ignacio Jiménez Jiménez por servirnos de ejemplo en todas las circunstancias.

Referencias

1. Alzheimer's disease International L. Alzheimer's Disease International Consortium, World Alzheimer Report. 2009.
2. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO *et al.*: *Neuroscience 2th Edition*. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; 2001.
3. Weiner HL, Frenkel D: **Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease**. *Nat Rev Immunol* 2006, **6**: 404-416.
4. Patterson C, Feightner JW, Garcia A, Hsiung GY, MacKnight C, Sadovnick AD: **Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease**. *CMAJ* 2008, **178**: 548-556.
5. Selkoe DJ: **Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy**. *Physiol Rev* 2001, **81**: 741-766.
6. Borroni B, Di LM, Padovani A: **Predicting Alzheimer dementia in mild cognitive impairment patients. Are biomarkers useful?** *Eur J Pharmacol* 2006, **545**: 73-80.
7. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H: **Alzheimer's disease**. *Lancet* 2006, **368**: 387-403.
8. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM: **Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease**. *Neurology* 1984, **34**: 939-944.
9. Walsh DM, Selkoe DJ: **Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease**. *Neuron* 2004, **44**: 181-193.
10. Milner B, Squire LR, Kandel ER: **Cognitive neuroscience and the study of memory**. *Neuron* 1998, **20**: 445-468.
11. Leranath C, Hajszan T: **Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus**. *Prog Brain Res* 2007, **163**: 63-84.
12. Greenstein B, Greenstein A: *Color Atlas of Neuroscience. Neuroanatomy and Neurophysiology*. New York. 2000: Thieme Stuttgart; 2000.
13. Rampon C, Tsien JZ: **Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity**. *Hippocampus* 2000, **10**: 605-609.
14. Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J *et al.*: **Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases**. *Nature* 2002, **416**: 507-511.
15. Soto C: **Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases**. *Nat Rev Neurosci* 2003, **4**: 49-60.
16. Kelly BL, Vassar R, Ferreira A: **Beta-amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons. A potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease**. *J Biol Chem* 2005, **280**: 31746-31753.
17. Terry RD: **Tangles precede plaques but don't cause them**. *Neurobiol Aging* 2004, **25**: 741-742.
18. Selkoe DJ: **Alzheimer's disease is a synaptic failure**. *Science* 2002, **298**: 789-791.
19. Kuppaswamy D, Dalton M, Pike LJ: **Serine 1002 is a site of in vivo and in vitro phosphorylation of the epidermal growth factor receptor**. *J Biol Chem* 1993, **268**: 19134-19142.
20. McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C *et al.*: **Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice**. *Neuron* 2005, **47**: 191-199.

21. Jan A, Gokce O, Luthi-Carter R, Lashuel HA: **The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity.** *J Biol Chem* 2008, **283**: 28176-28189.
22. Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB: **Amyloid beta - protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**: 330-335.
23. Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M: **An Overview of APP Processing Enzymes and Products.** *Neuromolecular Med* 2009.
24. Walsh DM, Selkoe DJ: **A beta oligomers - a decade of discovery.** *J Neurochem* 2007, **101**: 1172-1184.
25. Klein WL: **ADDLs & protofibrils--the missing links?** 2002.
26. Peña F, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Bernal-Pedraza R, Marquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L *et al.*: **Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase.** *Hippocampus* 2010, **20**: 78-96.
27. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I *et al.*: **Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory.** *Nat Med* 2008, **14**: 837-842.
28. Haass C, Selkoe DJ: **Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**: 101-112.
29. Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M *et al.*: **Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease.** *J Neurosci* 2007, **27**: 796-807.
30. Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W *et al.*: **Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice.** *EMBO J* 2008, **27**: 224-233.
31. Kaminsky YG, Marlatt MW, Smith MA, Kosenko EA: **Subcellular and metabolic examination of amyloid-beta peptides in Alzheimer disease pathogenesis: evidence for Abeta(25-35).** *Exp Neurol* 2010, **221**: 26-37.
32. Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW: **Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity.** *J Neurochem* 1995, **64**: 253-265.
33. Peña F, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Bernal-Pedraza R, Marquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L *et al.*: **Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase.** *Hippocampus* 2010, **20**: 78-96.
34. Bi H, Sze CI: **N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease.** *J Neurol Sci* 2002, **200**: 11-18.
35. Ashenafi S, Fuente A, Criado JM, Riobobos AS, Heredia M, Yajeya J: **Beta-Amyloid peptide25-35 depresses excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala "in vitro".** *Neurobiol Aging* 2005, **26**: 419-428.
36. Santos-Torres J, Fuente A, Criado JM, Riobobos AS, Heredia M, Yajeya J: **Glutamatergic synaptic depression by synthetic amyloid beta-peptide in the medial septum.** *J Neurosci Res* 2007, **85**: 634-648.
37. Tyszkiewicz JP, Yan Z: **beta-Amyloid peptides impair PKC-dependent functions of metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortical neurons.** *J Neurophysiol* 2005, **93**: 3102-3111.

38. Freir DB, Holscher C, Herron CE: **Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo.** *J Neurophysiol* 2001, **85**: 708-713.
39. Chen QS, Wei WZ, Shimahara T, Xie CW: **Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus.** *Neurobiol Learn Mem* 2002, **77**: 354-371.
40. Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G *et al.*: **High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation.** *J Neurosci* 2000, **20**: 4050-4058.
41. Kotilinek LA, Bacskai B, Westerman M, Kawarabayashi T, Younkin L, Hyman BT *et al.*: **Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease.** *J Neurosci* 2002, **22**: 6331-6335.
42. Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L: **The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders.** *Arch Med Res* 2001, **32**: 367-381.
43. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA: **Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity.** *J Struct Biol* 2000, **130**: 184-208.
44. Gasparini L, Dityatev A: **Beta-amyloid and glutamate receptors.** *Exp Neurol* 2008, **212**: 1-4.
45. Parameshwaran K, Dhanasekaran M, Suppiramaniam V: **Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation.** *Exp Neurol* 2008, **210**: 7-13.
46. Kew JN, Kemp JA: **Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology.** *Psychopharmacology (Berl)* 2005, **179**: 4-29.
47. Carter TL, Rissman RA, Mishizen-Eberz AJ, Wolfe BB, Hamilton RL, Gandy S *et al.*: **Differential preservation of AMPA receptor subunits in the hippocampi of Alzheimer's disease patients according to Braak stage.** *Exp Neurol* 2004, **187**: 299-309.
48. Pellegrini-Giampietro DE, Bennett MV, Zukin RS: **AMPA/kainate receptor gene expression in normal and Alzheimer's disease hippocampus.** *Neuroscience* 1994, **61**: 41-49.
49. Kohr G: **NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution.** *Cell Tissue Res* 2006, **326**: 439-446.
50. Wenzel A, Scheurer L, Kunzi R, Fritschy JM, Mohler H, Benke D: **Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain.** *Neuroreport* 1995, **7**: 45-48.
51. Paoletti P, Neyton J: **NMDA receptor subunits: function and pharmacology.** *Curr Opin Pharmacol* 2007, **7**: 39-47.
52. Li R, Huang FS, Abbas AK, Wigstrom H: **Role of NMDA receptor subtypes in different forms of NMDA-dependent synaptic plasticity.** *BMC Neurosci* 2007, **8**: 55.
53. Berberich S, Punnakkal P, Jensen V, Pawlak V, Seeburg PH, Hvalby O *et al.*: **Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation.** *J Neurosci* 2005, **25**: 6907-6910.
54. Danysz W, Parsons CG, Mobius HJ, Stoffler A, Quack G: **Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action.** *Neurotox Res* 2000, **2**: 85-97.
55. Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA, Carter TL, Ikonovic MD, Wolfe BB, Armstrong DM: **Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology.** *Neurobiol Dis* 2004, **15**: 80-92.

56. Dos-Anjos S, Martinez-Villayandre B, Montori S, Regueiro-Purrinos MM, Gonzalo-Orden JM, Fernandez-Lopez A: **Transient global ischemia in rat brain promotes different NMDA receptor regulation depending on the brain structure studied.** *Neurochem Int* 2009, **54**: 180-185.
57. Santos-Torres J, Fuente A, Criado JM, Riobos AS, Heredia M, Yajeya J: **Glutamatergic synaptic depression by synthetic amyloid beta-peptide in the medial septum.** *J Neurosci Res* 2007, **85**: 634-648.
58. Dos-Anjos S, Martinez-Villayandre B, Montori S, Perez-Garcia CC, Fernandez-Lopez A: **Early modifications in N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA levels in an oxygen and glucose deprivation model using rat hippocampal brain slices.** *Neuroscience* 2009, **164**: 1119-1126.
59. Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL: **Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway.** *J Neurosci* 2007, **27**: 2866-2875.
60. Caccamo A: **M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice.** 2006.
61. Sultana R, Butterfield DA: **Alterations of some membrane transport proteins in Alzheimer's disease: role of amyloid beta-peptide.** *Mol Biosyst* 2008, **4**: 36-41.
62. Paxinos G, Watson C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th edn. San Diego: Academic Press; 2007.
63. Bischofberger J, Engel D, Li L, Geiger JR, Jonas P: **Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices.** *Nat Protoc* 2006, **1**: 2075-2081.
64. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**: e45.

CAPITULO 2

Efectos analgésicos de la administración aguda y repetida de la morfina en ratones silvestres (wild-type) y modificados genéticamente (knockout) para el receptor sigma-1.

**C. Sánchez Fernández
E.J. Cobos
R. González-Cano
D. Zamanillo
E. Del Pozo**

Efectos analgésicos de la administración aguda y repetida de la morfina en ratones silvestres (wild-type) y modificados genéticamente (knockout) para el receptor sigma-1

Cristina Sánchez Fernández¹, Enrique J. Cobos¹, Rafael González-Cano¹, Daniel Zamanillo² y Esperanza. Del Pozo¹.

1, Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias. Universidad de Granada. España

2, Laboratorios Esteve. Barcelona. España

Direcciones de correo electrónico:

CSF: zigena@correo.ugr.es

EJC: ejcobos@ugr.es

RGC: biorafa@correo.ugr.es

DZE: dzamanillo@esteva.es

EDP: edpozo@ugr.es

Resumen

Los ligandos de receptores sigma-1 (σ_1) modulan el efecto analgésico de los opioides y también están implicados en los mecanismos moleculares que subyacen en la tolerancia a opioides. Por ello en este trabajo nos planteamos evaluar el efecto analgésico de la morfina y el desarrollo de tolerancia a esta sustancia en ratones wild-type y knockout σ_1 en el test de la placa caliente. Se registró el tiempo de latencia para las respuestas de lamido de pata trasera y salto cuando el animal fue expuesto a la placa caliente a 50 ± 0.5 °C, después de 30 min de la inyección subcutánea de morfina (o su solvente, salino), tanto en animales pretratados con salino, como en los inyectados repetidamente con morfina.

La morfina produjo un efecto antinociceptivo dosis-dependiente en ambos grupos de ratones, siendo éste significativamente superior en ratones knockout σ_1 que en wild-type, especialmente cuando la latencia para la respuesta salto fue evaluada. Por otro lado, el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico de morfina fue similar en ambos grupos de animales, en las dos respuestas evaluadas.

Los resultados observados sugieren que el receptor σ_1 está implicado en el efecto analgésico agudo de morfina, pero no en el desarrollo de tolerancia a esta sustancia en el test de la placa caliente.

Introducción

Los receptores sigma (σ), en un principio considerados un subtipo de receptores opioides y posteriormente confundidos con el sitio de unión de la fenciclidina al receptor NMDA (N-methyl-D-aspartato), actualmente se describen como una entidad farmacológica diferente y única (9, 20, 33). Se han caracterizado farmacológicamente dos subtipos, σ_1 y σ_2 . El receptor σ_1 ha sido clonado en varias especies de animales y en humanos (21, 23). A nivel celular se encuentran localizados en la membrana plasmática y en membranas subcelulares, particularmente en el retículo endoplasmático, donde regulan los movimientos del calcio intracelular. Además, los receptores σ_1 modulan la actividad de algunos canales iónicos de membrana y de diferentes sistemas de neurotransmisión, principalmente del glutamatérgico (9).

Los receptores σ_1 están implicados en el proceso de transmisión nociceptiva. Anatómicamente se localizan en el sistema nervioso central en áreas de gran importancia para el control del dolor, como son las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal, la sustancia gris periacueductal, el locus coeruleus y en el bulbo raquídeo (1, 26). Diversos estudios conductuales en animales demuestran un papel funcional de los receptores σ_1 en la nocicepción. Así, en el test de la “respuesta flexora nociceptiva”, los agonistas selectivos σ_1 producen un efecto nociceptivo que es revertido mediante antagonistas selectivos σ_1 (38). También se ha descrito que la administración sistémica o espinal de diversos antagonistas σ_1 disminuye la respuesta dolorosa característica de la segunda fase del test de la formalina (5, 24), siendo este efecto igualmente observado en ratones en los que se ha bloqueado la expresión génica del receptor (ratones knockout σ_1) (5). Además, la hipersensibilidad mecánica desarrollada tras la administración intradérmica de capsaicina se reduce con la administración sistémica de antagonistas de los receptores σ_1 y también en ratones knockout σ_1 (13, 14).

Se ha descrito también una asociación funcional entre los receptores σ_1 y el sistema opioide. La administración sistémica del agonista selectivo (+)-pentazocina redujo la analgesia inducida por diferentes agonistas opioides en el test “tail-flick” (8, 30, 31). En este mismo test, los antagonistas σ_1 revirtieron los efectos de los agonistas, e incrementaron la analgesia inducida por opioides, indicando la presencia de un sistema antiopioide σ_1 tónicamente activo (8, 28).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, los receptores σ_1 modulan la neurotransmisión mediada por receptores NMDA. Se ha descrito que los agonistas σ_1 facilitan varios efectos inducidos con la activación del sistema glutamatérgico, a saber, efectos electrofisiológicos, la expresión de pNRs en el asta dorsal de la médula espinal y conductas nociceptivas, siendo estos efectos de facilitación reducidos con la administración de antagonistas selectivos σ_1 (7, 10, 24, 25, 29). Por otro lado, los receptores NMDA modulan el efecto analgésico agudo de los agonistas opioides μ (16) y están involucrados en la plasticidad neuronal subyacente al desarrollo de tolerancia morfínica (39).

Teniendo presente estos antecedentes, los objetivos de este trabajo fueron:

1. Comparar los efectos analgésicos de la administración aguda de morfina en ratones wild-type y knockout σ_1 en el test de la placa caliente.

2. Evaluar el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico de morfina en ratones wild-type y knockout σ_1 , en el test de la placa caliente.

Resultados

Efectos analgésicos de la administración aguda de morfina en ratones wild-type y knockout del receptor σ_1 .

El efecto analgésico de la morfina, 30 min tras su administración subcutánea (s.c.), fue estudiado en ratones wild-type y knockout del receptor σ_1 mediante el test de la placa caliente a $50\pm 0.5^\circ\text{C}$, evaluando el tiempo de latencia para las respuestas de lamido de pata trasera (LPT) y salto, y se comparó con el efecto del solvente (suero salino fisiológico), administrado en las mismas condiciones.

La administración s.c. de morfina (dosis 1-64 mg/kg) prolongó el tiempo de latencia para

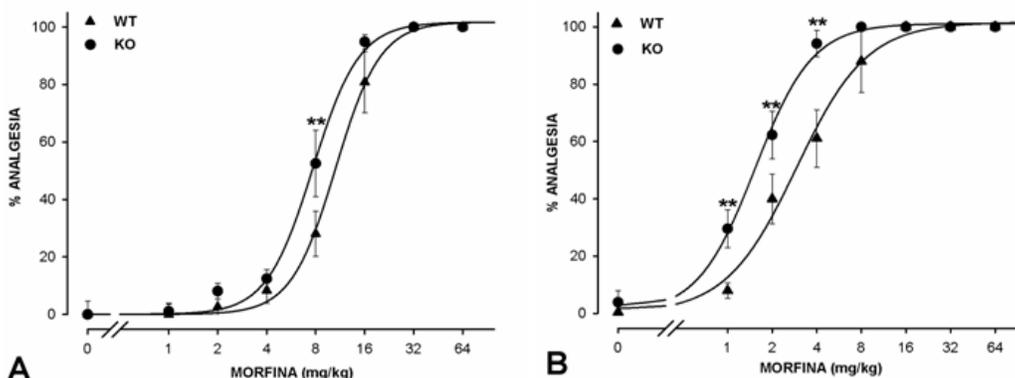


Figura 1. Efectos analgésicos de la morfina aguda en ratones wild-type y knockout σ_1 .

Tiempo de latencia para la respuesta de lamido de pata trasera -LPT- (A) y para el salto (B) en ratones wild-type (WT) y knockout (KO) σ_1 expuestos a la placa caliente (50°C), 30 min después de la administración aguda (s.c.) de diferentes dosis de morfina. Se representan los valores medios \pm ESM de los animales evaluados con cada tratamiento ($n=12$).

Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas entre ratones WT y KO σ_1 : ** $P<0.01$ (ANOVA de doble vía seguida del test de Bonferroni).

las respuestas LPT y salto en ambos tipos de animales, induciendo efectos antinociceptivos dosis-dependientes (Fig. 1A). Del análisis de las curvas dosis-respuesta LPT se deduce un valor de dosis eficaz 50 (dosis que produce el 50% del máximo efecto posible, DE_{50}) de 10.61 ± 0.60 y 7.69 ± 0.34 mg/kg para ratones wild-type y knockout σ_1 , respectivamente. Estos valores fueron estadísticamente diferentes ($P<0.05$). Es decir, la administración aguda de morfina indujo un efecto significativamente superior en ratones knockout σ_1 que en los wild-type, cuando se consideró la respuesta LPT. Adicionalmente, cuando se analizaron los datos registrados para la respuesta salto, se pudo comprobar que la diferencia en el efecto analgésico de la morfina en los ratones knockout σ_1 frente a los wild-type era aún mayor y que se producía una clara potenciación del efecto de la morfina en los animales desprovistos de receptores σ_1 (Fig. 1B). El análisis de las curvas dosis-respuesta salto arroja unos valores de DE_{50} de 2.93 ± 0.22 y 1.53 ± 0.06 mg/kg para animales wild-type y knockout σ_1 , respectivamente. Es decir, el efecto

analgésico de la morfina, para la respuesta salto en el test de la placa caliente, era significativamente muy superior ($P < 0.01$) en los ratones knockout σ_1 respecto a los ratones wild-type.

Tolerancia al efecto analgésico de la morfina en ratones wild-type y knockout σ_1 .

Los animales wild-type pretratados de manera repetida con morfina (ver métodos) desarrollaron tolerancia al efecto analgésico de esta sustancia, tanto cuando se evaluó el

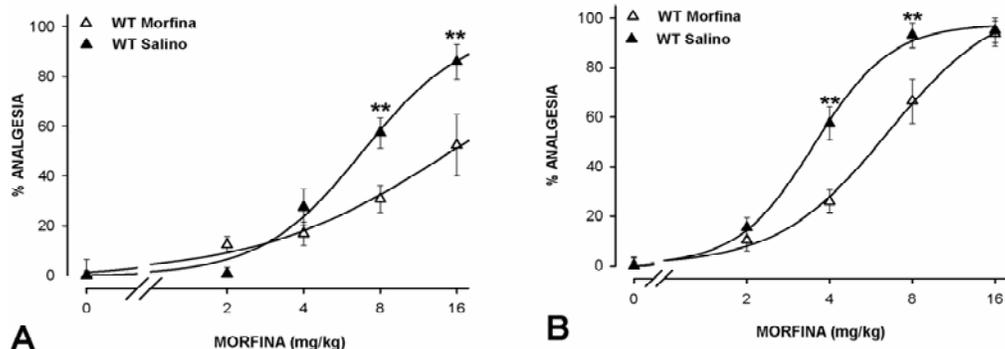


Figura 2. Tolerancia al efecto analgésico de la morfina en ratones wild-type y knockout σ_1 . Respuesta lamido de pata trasera.

Tiempo de latencia para la respuesta lamido de pata trasera (LPT) en ratones wild-type -WT- (A) y knockout -KO- σ_1 (B), pretratados con salino -símbolo relleno- y pretratados con morfina -símbolo vacío- (ver métodos).

Se representan los valores medios \pm ESM en cada grupo experimental ($n \geq 12$).

Diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ratones pretratados con morfina y con salino: ** $P < 0.01$ (ANOVA de doble vía seguida del test de Bonferroni).

tiempo de latencia para la respuesta LPT, como para el salto. Así, para la primera respuesta (LPT), se puede comprobar en la Fig. 2A que el efecto analgésico de morfina obtenido en animales tolerantes fue significativamente inferior ($P < 0.01$) que el obtenido en los animales

Tabla 1. Tolerancia a morfina. Respuesta lamido de pata trasera

Efectos analgésicos de morfina, expresados como dosis eficaz 50 (DE_{50}) \pm ESM, en ratones ($n \geq 12$) de tipo wild-type (WT) y knockout (KO) σ_1 pretratados con suero salino (grupo control) y con morfina (grupo tolerante) cuando la respuesta lamido de pata trasera (LPT) fue evaluada. Se representa el cociente (ratio) entre los valores de DE_{50} de morfina de los animales tolerantes y controles, así como las diferencias estadísticamente significativas (P) entre estos valores (ver métodos).

Latencia respuesta LPT	DE_{50} morfina (mg/kg) pretratados con salino	DE_{50} morfina (mg/kg) pretratados con morfina	RATIO	P
WT	6.83 \pm 0.36	15.29 \pm 1.16	2.23	<0.001
KO	6.55 \pm 0.60	11.46 \pm 0.77	1.75	<0.01

controles (tratados con salino), correspondiéndose con valores de DE_{50} de 15.29 ± 1.16 y 6.83 ± 0.36 mg/kg, respectivamente. Cuando se estudió la respuesta salto (Fig. 2B), los animales pretratados con morfina también exhibieron una disminución del tiempo de latencia (menor actividad analgésica) en relación a los controles, y ello se correspondió con valores de DE_{50} de 6.54 ± 0.34 y 3.51 ± 0.11 mg/kg, para ratones tolerantes a morfina y controles, respectivamente.

En los ratones knockout σ_1 (Fig. 3A y 3B) el pretratamiento con morfina también disminuyó de manera muy significativa los efectos analgésicos de ésta, es decir, indujo tolerancia. Los valores de DE_{50} para la respuesta LPT fueron estadísticamente superiores ($P < 0.01$) en ratones knockout σ_1 pretratados con morfina (11.46 ± 0.77 mg/kg) que en los pretratados con salino (6.55 ± 0.60 mg/kg) (Tabla 1). Para la respuesta salto éstos fueron de 3.88 ± 0.77 y 1.77 ± 0.09

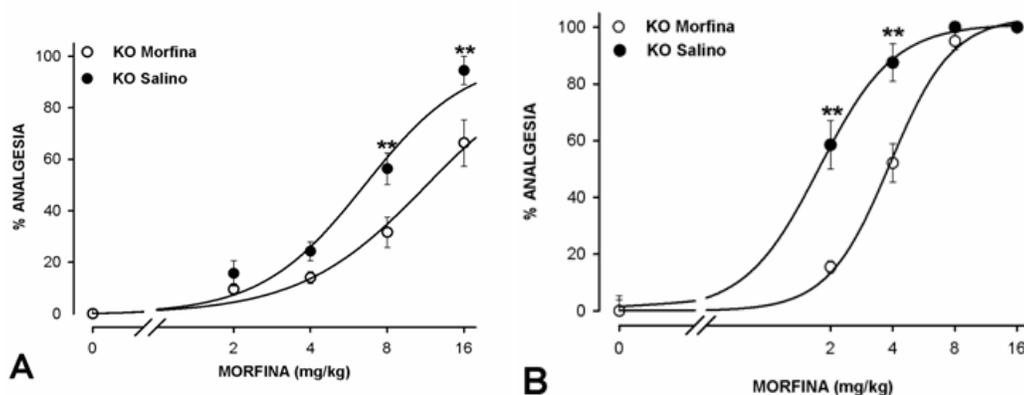


Figura 3. Tolerancia al efecto analgésico de la morfina en ratones wild-type y knockout σ_1 . Respuesta salto.

Tiempo de latencia para la respuesta salto en ratones wild-type -WT- (A) y knockout -KO- σ_1 (B), pretratados con salino -símbolo relleno- y pretratados con morfina -símbolo vacío- (ver métodos).

Se representan los valores medios \pm ESM en cada grupo experimental ($n \geq 12$).

Diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ratones pretratados con morfina y

mg/kg, para ratones tolerantes y controles, respectivamente (Tabla 2).

Se puede comprobar que el grado de incremento de los valores de DE_{50} fue similar en

Tabla 2. Tolerancia a morfina. Respuesta salto

Efectos analgésicos de morfina, expresados como dosis eficaz 50 (DE_{50}) \pm ESM, en ratones ($n \geq 12$) de tipo wild-type (WT) y knockout (KO) σ_1 pretratados con suero salino (grupo control) y con morfina (grupo tolerante) cuando la respuesta evaluada fue el salto. Se representa el cociente entre los valores de DE_{50} de morfina de los animales tolerantes y controles, así como las diferencias estadísticamente significativas (P) entre estos valores (ver métodos).

Latencia respuesta salto	DE_{50} morfina (mg/kg) pretratados con salino	DE_{50} morfina (mg/kg) pretratados con morfina	RATIO	P
WT	3.51 ± 0.11	6.54 ± 0.34	1.86	<0.001
KO	1.77 ± 0.09	3.88 ± 0.77	2.20	<0.001

animales tolerantes wild-type y en knockout σ_1 en relación a sus respectivos controles, y para ambas respuestas consideradas (Tablas 1 y 2).

Discusión

La morfina representa el prototipo de analgésico opioide con afinidad selectiva por los receptores opioides de tipo μ (12), lo cual le confiere, entre otras acciones, efecto analgésico. Dicho efecto se ejerce mediante la acción de esta sustancia sobre receptores situados en diversos puntos del SNC, tanto sobre el sistema aferente (las terminaciones de las fibras sensitivas primarias, neuronas de las láminas I y V, la sustancia gris periacueductal y periventricular, y los núcleos intralaminares del tálamo), como sobre el eferente, que regula la transmisión de la información nociceptiva en la médula espinal (17). En este trabajo se evalúa el efecto de la morfina mediante el test de la placa caliente en ratones midiendo el tiempo de latencia para dos respuestas conductuales, el lamido de pata trasera y el salto, dado que la evaluación de la morfina sistémica mediante la exposición a la placa caliente es un fenómeno complejo (15), en el que están implicados diversos sustratos neuronales tanto a nivel espinal como supraespinal. En nuestro modelo se aprecian diferencias de sensibilidad del efecto de la morfina según las diferentes respuestas conductuales observadas, siendo este fármaco más potente cuando se valora la respuesta salto que cuando se mide la respuesta lamido de pata trasera, lo cual coincide con lo descrito por otros autores (4, 34).

El efecto analgésico de morfina ha sido evaluado en animales wild-type y knockout σ_1 . Los ratones knockout σ_1 homocigotos (-/-) han sido generados por Langa et al., (27). Son viables, fértiles, y fenotípicamente semejantes a los ratones wild-type. Previamente se ha demostrado mediante estudios de PCR y de fijación del radioligando [^3H](+)-pentazocina la ausencia de receptores σ_1 en ratones knockout σ_1 , mientras que son expresados en los ratones wild-type (13). Por lo tanto, estos animales genéticamente modificados proporcionan una herramienta útil e interesante para evaluar el papel del receptor σ_1 en procesos fisiológicos y fisiopatológicos. En este trabajo se han utilizado para determinar el rol de estos receptores en la transmisión nociceptiva aguda, en la analgesia morfínica, y en el desarrollo de tolerancia a este fármaco.

El umbral para las respuestas nociceptivas (LPT y salto) evaluadas mediante el test de la placa caliente en ratones knockout σ_1 fue semejante al de los ratones wild-type, es decir que, aparentemente, el proceso de transmisión dolorosa es semejante en ambos tipos de animales. Sin embargo, el efecto analgésico inducido por morfina fue superior en animales desprovistos de receptores σ_1 , para ambas respuestas conductuales evaluadas. Ello sugiere un papel de estos receptores en los efectos antinociceptivos inducidos por este opioide. Este es el primer estudio que aborda esta cuestión utilizando animales genéticamente modificados. Estudios previos habían demostrado que los efectos analgésicos de morfina y de otros opioides de tipo μ se potenciaban con la administración sistémica de antagonistas farmacológicos de receptores σ_1 haloperidol (8) y (+)-MR200 (28), y de oligonucleótidos antisentido σ_1 (30) en el test nociceptivo de retirada de la cola de un foco calorífico. Nuestros datos completan y amplían dichos estudios.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la respuesta salto del animal es una respuesta compleja e implica un alto grado de coordinación psicomotora. La evaluación de la misma puede inducir a falsos positivos cuando el fármaco posee actividad sedante e induce incoordinación motora. Para descartar que tales efectos sedantes pudieran enmascarar la respuesta antinociceptiva de la morfina, se realizaron experimentos con el test del rotarod,

que explora alteraciones en la coordinación motora, en ambos tipos de animales (datos no mostrados). Pudimos comprobar que: (a) los animales knockout σ_1 tuvieron las mismas respuestas basales que los ratones wild-type, lo que sugiere que el fenotipo de estos ratones, en relación a coordinación psicomotora, es normal, y (b) la dosis de morfina de 2 mg/kg, que ejerce un claro efecto analgésico en animales wild-type, el cual es potenciado en los knockout σ_1 , no producía incoordinación psicomotora en ningún tipo de animales. Todo ello descarta que un supuesto efecto sedante de la morfina (2 mg/kg) pudiera influir en la respuesta antinociceptiva cuando se evalúa la respuesta salto.

Por otro lado, y tal y como está descrito, morfina indujo tolerancia a su efecto analgésico en este test. Con el protocolo de inducción de tolerancia utilizado, la DE_{50} de morfina para ambas respuestas evaluadas resultó ser aproximadamente el doble en los animales wild-type pretratados con morfina respecto a sus controles, datos que concuerdan con los obtenidos previamente utilizando este test de analgesia (19). De igual manera, los ratones knockout σ_1 también desarrollaron tolerancia al efecto analgésico de morfina, en semejante grado al de los wild-type. Por lo tanto, la hipótesis de partida, de que los ratones desprovistos de receptores σ_1 mostrarían un desarrollo de tolerancia morfínica diferente al de los ratones wild-type no se confirmó con este trabajo. Es sabido que en los fenómenos de tolerancia morfínica se producen cambios adaptativos a nivel celular que implican a canales iónicos de calcio (11), potasio (19, 40), sistema de neurotransmisión glutamatérgico (39), del óxido nítrico (36), entre otros (18). Los receptores σ_1 intervienen a nivel celular en la homeostasis del calcio intracelular (22, 37). Así mismo, modifican la actividad de canales plasmáticos de potasio (2) y de calcio (22, 35). También modulan el sistema de neurotransmisión glutamatérgico (véase para una revisión 9), afectando la actividad eléctrica neuronal inducida por NMDA (33), potenciando la neurotransmisión glutamatérgica en hipocampo (32) y modulando otros sistemas de neurotransmisión indirectamente a través de éste (revisado en 3, 33). Se ha descrito que en algunos de estos sistemas la modulación inducida por ligandos sigma exhibe características duales, ejerciendo las dosis menores de ligandos σ_1 efectos opuestos al de las dosis mayores (9). La existencia del fenómeno anterior, junto con las múltiples posibilidades de actuación de los receptores σ_1 en los fenómenos que subyacen a la tolerancia morfínica, podría explicar que, aparentemente, estos receptores no jueguen un papel claro y clave en los fenómenos de tolerancia morfínica en nuestras condiciones experimentales.

Conclusiones

Estos resultados muestran que los efectos analgésicos de la morfina aguda en el test de la placa caliente son mayores en ratones knockout σ_1 que en wild-type, especialmente cuando se considera el tiempo de latencia para la respuesta salto.

Sin embargo, la ausencia de receptores σ_1 en ratones no modifica el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico de morfina en este test.

Métodos

Animales

Los experimentos fueron realizados en ratones hembras silvestres, fenotípicamente normales (wild-type), procedentes de Charles River (Barcelona, España) y knockout σ_1 (Laboratorios Esteve), de 25-30 g de peso. Los animales se mantuvieron en un habitáculo del estabulario con condiciones de temperatura controlada (21 ± 1 °C), cambios de aire cada 20 min y un ciclo automático de luz/oscuridad (de 08.00 a 20.00h). Se les proporcionó una dieta estándar (Harlan Teklad Research diet, Madison, USA) y agua *ad libitum* hasta el comienzo de los experimentos. Los estudios comportamentales se realizaron durante la fase de luz (09.00-15.00 h) y cada ratón fue evaluado una sola vez. Los animales fueron manipulados de acuerdo a la normativa del Consejo Directivo de la Comunidad Europea del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/ECC). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de la Universidad de Granada, España.

Administración de fármacos

Como prototipo de agonista de receptores opioides μ se utilizó hidrocloreuro de morfina (Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad y Política Social, España). Tanto este fármaco como su solvente (suero fisiológico estéril) fueron administrados por vía subcutánea (s.c.), en la zona interescapular, en un volumen de 5 ml/kg.

Para inducir tolerancia los ratones recibieron dos inyecciones de morfina diarias por vía intraperitoneal (i.p.), durante tres días consecutivos, con un intervalo de 12 h. Las dosis administradas fueron de 20, 40, 40, 80, 80 y 20 mg/kg. La última dosis se redujo para evitar efectos residuales durante la evaluación del animal. Dieciséis horas después de la última inyección de morfina o su solvente los ratones fueron evaluados en el test de la placa caliente, tal y como se describe a continuación.

Procedimientos experimentales

Los efectos antinociceptivos de la morfina fueron estudiados mediante el test de la placa caliente. Para ello, 30 min después de la administración de morfina o su solvente, se colocó a los animales sobre una superficie de metal cuya temperatura era mantenida constante a 50 ± 1 °C, por un baño de agua termostaticado. Se evaluó el umbral de dolor midiendo el tiempo de latencia para las respuestas de lamido de pata trasera (LPT) y salto tras el primer contacto con la placa caliente. Los tiempos de corte utilizados, con objeto de evitar el daño tisular, fueron de 80 y 300 s para el lamido de la pata trasera y salto, respectivamente.

Para descartar que un posible efecto de la morfina sobre la coordinación motora afectara a las respuestas evaluadas en el test de la placa caliente, se analizaron los efectos de esta sustancia mediante el test de rotarod (Cibertec, Madrid, España), tal y como previamente se ha descrito (8). Para ello se colocó a cada ratón en un cilindro elevado que giraba continuamente con aceleración. Los ratones debían caminar sobre el cilindro en sentido opuesto al movimiento de éste y a una velocidad que aumentaba de 4 a 40 rpm en un tiempo de 300 s. La variable analizada fue el tiempo de latencia para la caída, el cual se registró automáticamente. Se estableció un tiempo de permanencia máximo (tiempo de corte) de 300 s. Veinticuatro horas antes del experimento, los animales fueron habituados al aparato con tres sesiones de entrenamiento separadas entre sí por un intervalo de 30 min. El día del experimento, los registros se efectuaron inmediatamente antes (tiempo 0) y 30 min después

de la administración del fármaco o el vehículo. Este tiempo fue elegido porque era el tiempo utilizado para la evaluación de los efectos antinociceptivos de la morfina.

Análisis de datos

Los resultados se representan como la media \pm ESM. Los efectos analgésicos fueron calculados conforme a la fórmula: % analgesia = $[(LTT - LTC) / (CT - LTC)] \times 100$. Donde LTT es el tiempo de latencia para las respuestas evaluadas en los ratones tratados con el fármaco, LTC es el tiempo de latencia en los animales control (tratados con el solvente del fármaco) y CT es el tiempo de corte. Los valores medios obtenidos en varios grupos experimentales fueron comparados mediante un análisis de la varianza de doble vía (ANOVA), seguido de un test de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de P fue menor de 0.05. Todos los cálculos se realizaron usando SigmaStat 2.03. Los valores de DE_{50} (dosis de fármaco que produce la mitad del efecto máximo) se calcularon a partir de la curva dosis-respuesta utilizando un análisis de regresión no lineal de la ecuación para una sigmoide. Este análisis fueron realizados con el programa SigmaPlot 2002 v. 8.0 (SPSS Inc., IL, USA). Los parámetros de diferentes curvas dosis-respuestas se compararon con el test de la F de Snedecor's, mediante el programa GraphPad Prism 3.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)

Agradecimientos

El estudio fue parcialmente financiado por la Junta de Andalucía (CTS-109), MEC (SAF2006-06122), Laboratorios Dr Esteve S.A. y beca FPU de C.S.F.

Referencias

1. Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoaï M, Maurice T: **Immunocytochemical localization of the sigma₁ receptor in the adult rat central nervous system.** *Neuroscience* 2000; **97**:155-170.
2. Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA, Jackson MB: **The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit.** *Neuron* 2002; **34**:399-410.
3. Bermack JE, Debonnel G: **The role of sigma receptors in depression.** *J. Pharmacol. Sci.* 2005; **97**:317-336.
4. Bredeloux P, Costentin J, Dubuc I: **Interactions between NTS2 neurotensin and opioid receptors on two nociceptive responses assessed on the hot plate test in mice.** *Behav. Brain Res.* 2006; **175**:399-407.
5. Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Baeyens JM: **Antinociceptive effects of haloperidol and its metabolites in the formalin test in mice.** *Psychopharmacology (Berl)* 2005; **182**:485-493.
6. Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Montoliu L, Baeyens JM: **Formalin-induced pain is reduced in sigma₁ receptor knockout mice** *Eur. J. Pharmacol.* 2005; **511**:73-74.
7. Chen L, Dai XN, Sokabe M: **Chronic administration of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) primes for facilitated induction of long-term potentiation via sigma 1 (sigma₁) receptor: optical imaging study in rat hippocampal slices.** *Neuropharmacology* 2006; **50**:380-392
8. Chien CC, Pasternak GW: **Selective antagonism of opioid analgesia by a sigma system.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994; **271**:1583-1590.
9. Cobos EJ, Entrena JM, Cendán CM, Del Pozo E: **Pharmacology and therapeutic potential of sigma₁ receptor ligands.** *Curr. Neuropharmacol.* 2008; **6**:344-366.
10. Debonnel G, de Montigny C: **Modulation of NMDA and dopaminergic neurotransmissions by sigma ligands: possible implications for the treatment of psychiatric disorders.** *Life Sci.* 1996; **58**:721-734.
11. Díaz A, Flórez J, Pazos A, Hurlé MA: **Opioid tolerance and supersensitivity induce regional changes in the autoradiographic density of dihydropyridine-sensitive calcium channels in the rat central nervous system.** *Pain* 2000; **86**:227-235.
12. Emmerson PJ, Liu MR, Woods JH, Medzihradsky F: **Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes:** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994; **271**:1630-1637.
13. Entrena JM, Cobos EJ, Nieto FR, Cendán CM, Gris G, Del Pozo E, Zamanillo D, Baeyens JM: **Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice.** *Pain* 2009; **143**:252-261.
14. Entrena JM, Cobos EJ, Nieto FR, Cendán CM, Baeyens JM, Del Pozo E: **Antagonism by haloperidol and its metabolites of mechanical hypersensitivity induced by intraplantar capsaicin in mice: role of sigma-1 receptors.** *Psychopharmacology (Berl)* 2009; **205**:21-33.
15. Espejo EF, Mir D: **Differential effects of weekly and daily exposure to the hot plate on the rat's behavior.** *Physiol. Behav.* 1994; **55**:1157-1162.
16. Fischer BD, Carrigan KA, Dykstra LA: **Effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on acute morphine-induced and l-methadone-induced antinociception in mice.** *J. Pain* 2005; **6**:425-433.
17. Flórez J: **Fármacos analgésicos opioides.** Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A (ed). *Farmacología Humana. Elsevier 2008*, 523-542.

18. Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P: **Do pharmacological approaches that prevent opioid tolerance target different elements in the same regulatory machinery?** *Curr. Drug Abuse Rev.* 2008; **1**:222-238.
19. González LG, Portillo E, Del Pozo E, Baeyens JM: **Changes in [³H]glibenclamide binding to mouse forebrain membranes during morphine tolerance.** *Eur. J. Pharmacol.* 2001; **18**:29-37.
20. Guitart X, Codony X, Monroy X: **Sigma receptors: biology and therapeutic potential.** *Psychopharmacology (Berl)* 2004; **174**:301-319.
21. Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E, Glossmann H: **Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma₁-binding site.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; **93**:8072-8077.
22. Hayashi T, Maurice T, Su TP: **Ca²⁺ signaling via σ₁-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca²⁺ concentration.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; **293**:788-798.
23. Hayashi T, Su TP: **An update on the development of drugs for neuropsychiatric disorders: focusing on the σ₁ receptor ligand.** *Expert Opin. Ther. Targets.* 2008; **12**:45-58.
24. Kim HW, Kwon YB, Roh DH, Yoon SY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH: **Intrathecal treatment with σ₁ receptor antagonists reduces formalin-induced phosphorylation of NMDA receptor subunit 1 and the second phase of formalin test in mice.** *Br. J. Pharmacol.* 2006; **148**:490-498.
25. Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Seo HS, Kwon YB, Han HJ, Kim KW, Beitz AJ, Lee JH. **Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice.** *Br. J. Pharmacol.* 2008; **154**:1125-1134.
26. Kitaichi K, Chabot JG, Moebius FF, Flandorfer A, Glossmann H, Quirion R: **Expression of the purported sigma(1) (σ₁) receptor in the mammalian brain and its possible relevance in deficits induced by antagonism of the NMDA receptor complex as revealed using an antisense strategy.** *J. Chem. Neuroanat.* 2000; **20**:375-387.
27. Langa F, Codony X, Tovar V, Lavado A, Gimenez E, Cozar P, Cantero M, Dordal A, Hernandez E, Perez R, Monroy X, Zamanillo D, Guitart X, Montoliu L. **Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (r1) knockout mice.** *Eur. J. Neurosci.* 2003; **18**:2188-2196.
28. Marrazzo A, Parenti C, Scavo V, Ronsisvalle S, Scoto GM, Ronsisvalle G: **In vivo evaluation of (+)-MR200 as a new selective sigma ligand modulating MOP, DOP and KOP supraspinal analgesia.** *Life Sci.* 2006; **78**:2449-2453.
29. Martina M, Turcotte ME, Halman S, Bergeron R: **The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus.** *J. Physiol.* 2007; **578**:143-157.
30. Mei J, Pasternak GW: **σ₁ receptor modulation of opioid analgesia in the mouse.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; **300**:1070-1074.
31. Mei J, Pasternak GW: **Modulation of brainstem opiate analgesia in the rat by σ₁ receptors: a microinjection study.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; **322**:1278-1285.
32. Meyer DA, Carta M, Partridge LD, Covey DF, Valenzuela CF: **Neurosteroids enhance spontaneous glutamate release in hippocampal neurons. Possible role of metabotropic σ₁-like receptors.** *J. Biol. Chem.* 2002; **277**:28725-28732.
33. Monnet FP, Maurice T: **The sigma₁ protein as a target for the non-genomic effects of neuro(active)steroids: molecular, physiological, and behavioral aspects.** *J. Pharmacol. Sci.* 2006; **100**:93-118.

34. Portillo E, Cendán CM, Del Pozo E, Baeyens JM: **Morphine induced antinociception in the hot plate test is influenced by the response considered as endpoint.** *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2000; **22**:487.
35. Tchedre KT, Huang RQ, Dibas A, Krishnamoorthy RR, Dillon GH, Yorio T: **Sigma-1 receptor regulation of voltage-gated calcium channels involves a direct interaction.** *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008; **49**:4993–5002.
36. Toda N, Kishioka S, Hatano Y, Toda H: **Modulation of opioid actions by nitric oxide signaling.** *Anesthesiology* 2009; **11**:166-181.
37. Tsai SY, Hayashi T, Mori T, Su TP: **Sigma-1 receptor chaperones and diseases.** *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 2009; **9**:184–189.
38. Ueda H, Inoue M, Yoshida A, Mizuno K, Yamamoto H, Maruo J, Matsuno K, Mita S: **Metabotropic neurosteroid/sigma-receptor involved in stimulation of nociceptor endings of mice.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; **298**:703-710.
39. Ueda H, Ueda M: **Mechanisms underlying morphine analgesic tolerance and dependence.** *Front. Biosci.* 2009; **14**:5260-5272.
40. Zhang G, Lagrange AH, Rønnekleiv OK, Kelly MJ: **Tolerance of hypothalamic beta-endorphin neurons to mu-opioid receptor activation after chronic morphine.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; **277**:551-558.

CAPITULO 3

Variabilidad genética en el gen HTR2A y riesgo para depresión

***E. Molina
J.A. Cervilla
M. Rivera
F. Torres-González
B. Gutiérrez***

Variabilidad genética en el gen HTR2A y riesgo para depresión

Esther Molina^{1, 2, 3}, Jorge A. Cervilla^{1, 2, 3, 4}, Margarita Rivera^{1, 2, 3}, Francisco Torres-González³ y Blanca Gutiérrez^{1, 2, 3}

1, Instituto de Neurociencias Federico Olóriz, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

2, Sección de Psiquiatría y Psicología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

3, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM). Ministerio de Ciencia e Innovación.

4, Unidad de Apoyo a la Investigación en Salud Mental, Plan Integral de Salud Mental Andalucía, Unidad de Agudos de Salud Mental, Hospital Universitario San Cecilio, Granada

Direcciones de correo electrónico:

EM: emrivas@ugr.es

JC: jacb@ugr.es

MR: mrivera@ugr.es

FT-G: ftorres@ugr.es

BG: blancag@ugr.es

Resumen

Introducción. Existen numerosas evidencias que apuntan hacia la existencia de una disfunción del sistema de neurotransmisión serotoninérgica en la etiología de la depresión. El receptor de serotonina 5-HT_{2A} juega un importante papel en este sistema. Es por ello que el gen que codifica para este receptor, el gen HTR2A, ha sido clásicamente considerado un gen candidato para la depresión. Aunque algunos trabajos describen una asociación entre la variabilidad de HTR2A y la depresión, o incluso entre dicho gen y ciertas características clínicas asociadas a este trastorno, tales como la estacionalidad o la ideación y el comportamiento suicida, los resultados no son concluyentes ya que hay numerosos estudios en los que esa asociación no se detecta. Detrás de estos hallazgos, en apariencia contradictorios, puede haber problemas de tamaño muestral, de definición de fenotipo o de análisis de un número insuficiente de marcadores genéticos dentro del gen HTR2A, entre otros. Dado el papel clave del receptor 5-HT_{2A} en la neurotransmisión serotoninérgica y su implicación en los mecanismos de respuesta al tratamiento antidepresivo, nuestro objetivo en el presente estudio fue explorar, en una amplia y bien caracterizada muestra de pacientes de atención primaria, la posible implicación del gen HTR2A en el origen de la depresión y el comportamiento suicida.

Métodos. Un total de 918 usuarios de los servicios de atención primaria que estaban participando en el estudio PREDICT-GENE (1) fueron evaluados para la presencia de depresión grave y de rasgos clínicos de este trastorno, tales como la ideación y el comportamiento suicidas, a través de la Entrevista Diagnóstica Compuesta Internacional o CIDI. De ellos, 251 cumplían criterios diagnósticos CIE-10 para un episodio depresivo grave. Los análisis genéticos se centraron en 6 polimorfismos localizados a lo largo de toda la secuencia del gen HTR2A. Se usó el paquete estadístico SPSS para realizar los test de asociación y calcular las Odds Ratio. La estimación de las frecuencias haplotípicas se hizo con el programa UNPHASED.

Resultados. Nuestros resultados mostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias alélicas, genotípicas ni haplotípicas entre los individuos con episodio depresivo grave y los controles ($p > 0.05$ en todos los casos). Tampoco las hubo al comparar los individuos con ideación o comportamiento suicida y los que no tenían tal rasgo, tanto en el total de la muestra (suicidas vs. no suicidas) como dentro del grupo de deprimidos graves (deprimidos suicidas vs. deprimidos no suicidas).

Conclusión. El gen HTR2A no parece conferir riesgos incrementados para depresión ni para ideación o comportamiento suicida.

Introducción

Concepto y epidemiología de la depresión

Todos conocemos por propia experiencia el significado de la palabra tristeza. Es un sentimiento que aparece en respuesta a muy diversas situaciones, con una intensidad y duración acordes con el hecho que lo ha desencadenado y que desaparece tras cierto tiempo. Sin embargo, algunas personas experimentan una tristeza patológica, que perdura en el tiempo e interfiere gravemente en su vida diaria.

El trastorno depresivo mayor o depresión unipolar se define como un trastorno del estado de ánimo caracterizado por un estado de ánimo anormalmente bajo (hipotimia), una pérdida de interés o de capacidad para obtener placer por las cosas (anhedonia) y una extraordinaria fatigabilidad. Estos síntomas nucleares suelen ir acompañados de otros síntomas que suponen alteraciones en distintas funciones biológicas y cognitivas del individuo, como la disminución de la capacidad para pensar, concentrarse o tomar decisiones, pensamientos de muerte y desesperanza, alteraciones del sueño, disminución del apetito, enlentecimiento motor o disminución de la libido. La sintomatología debe estar presente durante al menos dos semanas e inducir discapacidad. Además debe descartarse que los síntomas sean debidos a una causa orgánica.

Los trastornos del humor, y en especial la depresión mayor, se encuentran entre las enfermedades más frecuentes, recurrentes y discapacitantes en los países desarrollados, con una prevalencia del 2-5% en población general y del 11-18% en atención primaria, siendo España uno de los países europeos con mayor prevalencia de depresión (2). La incidencia es de 200 nuevos casos /10000 individuos-año (3) y constituye la segunda causa de discapacidad medida de DALYs (Dissability Adjusted Living Years), en el ranking global de enfermedades, tan sólo superada por las enfermedades cardiovasculares (4).

Etiología de la depresión

La depresión es una enfermedad compleja y multifactorial en la que convergen numerosos factores de tipo psicosocial y biológico que pueden predisponer, desencadenar o perpetuar el trastorno.

Entre los factores de riesgo psicológicos para depresión se encuentran los rasgos neuróticos de personalidad, los sesgos cognitivos (que se traducen en pensamientos automáticos negativos que hacen tener una actitud pesimista), una baja autoestima, la dependencia social, la introversión o el comportamiento obsesivo (5, 6).

Las experiencias de abuso o de privación maternal en la infancia (7-17) o sufrir acontecimientos vitales estresantes (tales como la muerte de un ser querido, una ruptura de pareja o la pérdida del empleo) (18), han sido descritos como factores de riesgo de tipo socio-ambiental para padecer depresión (19, 20).

El componente biológico existente en la etiología de la depresión se ha relacionado con una disfunción inespecífica de la neurotransmisión monoaminérgica, principalmente de serotonina, noradrenalina y dopamina, en zonas del cerebro tales como la amígdala, el

hipotálamo y la corteza cerebral (hipótesis monoaminérgica) (21-25). Las bases biológicas de este trastorno apuntan, además, hacia la existencia de un mal funcionamiento del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (26-34) y de una vulnerabilidad genética individual (35).

En las Figuras 1 y 2 se representan las principales evidencias neuroquímicas y endocrinológicas, respectivamente, asociadas a depresión.

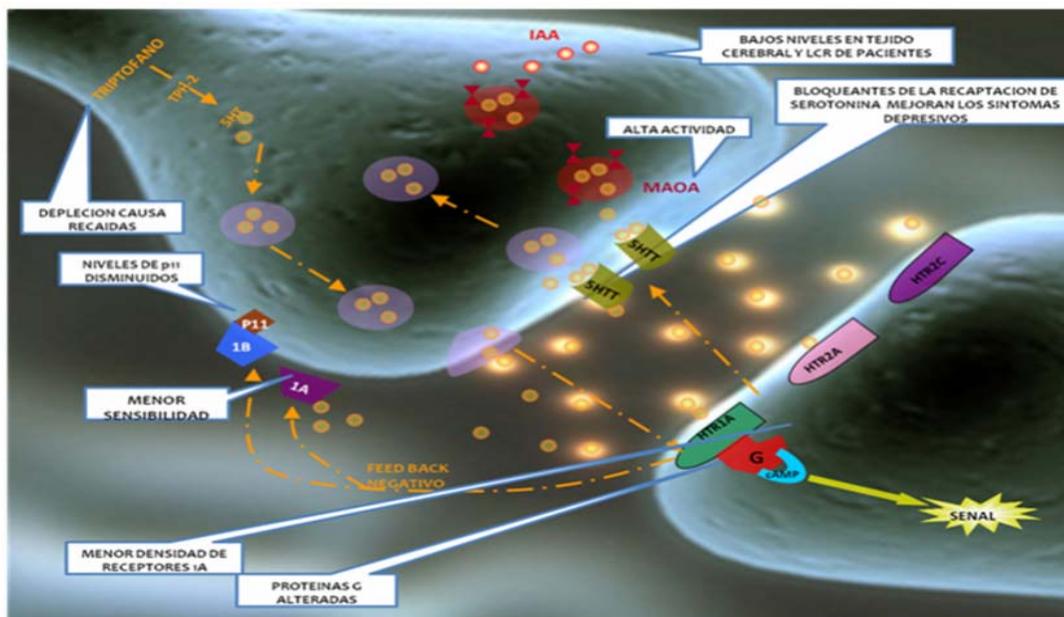


Figura 1: Principales hallazgos a favor de la hipótesis de la disfunción serotoninérgica en depresión. Tomado de Molina, 2009 (36).

La hipótesis monoaminérgica centra la fisiopatología de la depresión en la existencia de una deficiencia de los neurotransmisores serotonina, noradrenalina y/o dopamina en el sistema nervioso central. Tal idea surge en los años 50 al observarse, de modo casual, una mejora en los síntomas de pacientes depresivos a los que se les había administrado drogas cuyo efecto implicaba la elevación de las concentraciones de tales neurotransmisores en el espacio presináptico (22). No tardaron en encontrarse evidencias que apoyaban esta teoría, tales como la existencia de bajos niveles de serotonina y de su principal metabolito, 5-hidroxi-indolacético (IAA) en tejido cerebral y en líquido cefalorraquídeo y una menor concentración de triptófano (molécula precursora de la síntesis de la serotonina) en sangre de pacientes depresivos suicidas (21). Además la depleción del triptófano induce nuevos episodios en pacientes y ánimo disfórico en sus familiares de primer grado (25). También se observó un incremento de la densidad de receptores postsinápticos 5-HT_{2A} y de moléculas transportadoras de serotonina (SERT) en la corteza frontal de individuos deprimidos suicidas, lo cual podría explicarse por una respuesta adaptativa de estas moléculas ante la reducción sináptica de la serotonina (21). En individuos deprimidos la densidad de los receptores postsinápticos serotoninérgicos de tipo 1A está disminuida, mientras que los autorreceptores reguladores 1^a y 1B son menos sensibles en estos individuos (23, 24). Se ha descrito además una disfunción de la transmisión de señal por parte de las proteínas G.

La implicación de la noradrenalina en la etiología de la depresión se puso de manifiesto al observarse que los fármacos que inhiben la recaptación de noradrenalina y favorecen la neurotransmisión noradrenérgica, producen una mejora de los síntomas depresivos (37) y que existe una disminución de la síntesis de noradrenalina, un descenso de los receptores α y β adrenérgicos y un aumento del metabolito MHPG (marcador de la actividad presináptica de las neuronas noradrenérgicas en pacientes con depresión (38).

Por último, el sistema dopaminérgico muestra también evidencias de estar implicado en la etiología de la depresión, tales como la existencia de fármacos antidepressivos (como bupropión o nomifensina) y sustancias como las anfetaminas que tienen un efecto bloqueante de la recaptación de dopamina y que producen una elevación del estado de ánimo.

Así pues, parece que las monoaminas, en especial la serotonina juegan un papel clave en la etiología de la depresión.

La investigación en genética psiquiátrica se ha tornado fundamental en el entendimiento de la naturaleza de la enfermedad mental. Los estudios de genética psiquiátrica están ayudando a identificar los genes de susceptibilidad para distintas enfermedades mentales; están permitiendo también conocer mejor la etiología de determinados trastornos, redefinir fenotipos clínicos y proporcionar las claves para mejorar los tratamientos, identificando de forma individualizada cuál es el fármaco con mayor probabilidad de responder mejor y con menos efectos secundarios (Farmacogenética).

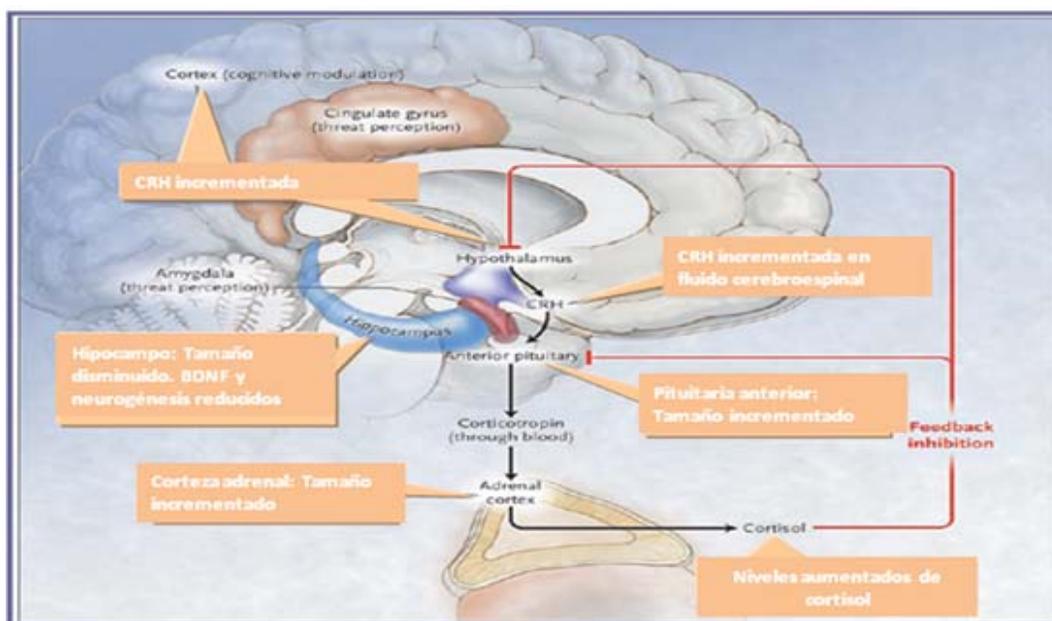


Figura 2. Hallazgos principales que involucran al eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en la fisiopatología de la depresión. Figura modificada de Betmaker et al, 2008 (26).

Ante situaciones de estrés, el organismo reacciona dando lugar a una serie de respuestas adaptativas a nivel del sistema nervioso central y periférico. Alteraciones en el modo en que una persona responde ante las situaciones estresantes que aparecen en la vida, podrían determinar la aparición de una patología depresiva (28, 30, 33). Numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de una elevación de los niveles de cortisol y del factor liberador de corticotropina (CRH) al menos en un 50% de los pacientes deprimidos, no debido al estrés producido por la enfermedad, ya que esta alteración afecta también al ritmo circadiano de secreción de cortisol (alto por la tarde y al principio de la noche), hecho que no ocurre en las situaciones de estrés. Estos pacientes presentan una incapacidad de sus sistema hipotalámico-hipófiso-adrenal (HHA) para suprimir el cortisol plasmático. Este hecho se ha interpretado como una falta de acoplamiento del sistema simpático-adrenal al eje HHA debido a una intensa producción de factores liberadores, o como una hiperactivación del sistema simpático-adrenal como consecuencia de la hiperactividad del eje HHA (27). Sin embargo estos hallazgos son controvertidos por su inespecificidad, ya que también se han descrito en manía, esquizofrenia y demencia, por lo que, más bien, parecen ser debidos al padecimiento de enfermedad mental y no específicamente de depresión (29). Sin embargo, quizá el cortisol juegue un importante papel en la etiología de la depresión postraumática. Tal situación estresante induciría una hipersecreción de cortisona, que produciría una elevación sostenida de los niveles de cortisol, lo cual, a su vez, provocaría una alteración del sistema serotoninérgico (31). Así pues, respuestas excesivas o bien inadecuadas (en duración o en magnitud) a factores estresantes pueden provocar depresión. De hecho, en el sujeto depresivo aparecen ciertas características comunes a una situación de respuesta mantenida al estrés (anorexia, pérdida de la libido, taquicardias, hipertensión, etc.) Serían, por tanto, los circuitos cerebrales del eje HHA encargados de controlar la respuesta al estrés los involucrados, al menos en parte, en la etiopatogenia de la depresión (30, 34). Algunos autores han demostrado un efecto del estrés mantenido sobre vías de neurotransmisión serotoninérgica, disminuyendo la concentración de serotonina en el espacio intersináptico (32).

Bases Genéticas de la Depresión.

Los estudios de familias, gemelos y adopción, llevados a cabo desde la genética psiquiátrica clásica, han descrito riesgos incrementados para depresión entre los familiares de primer grado de individuos afectados (39) y han sugerido tasas de heredabilidad para el trastorno depresivo (esto es, la proporción de varianza genética implicada en la varianza fenotípica del trastorno) de en torno el 40% (40-42).

A través de los estudios de ligamiento y de asociación, y gracias a las nuevas técnicas de biología molecular, ha sido posible explorar el genoma en busca de *loci* de susceptibilidad. Los estudios de ligamiento han propuesto algunas localizaciones en los cromosomas 1, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18 y 21, entre otros, que parecen heredarse ligadas a la depresión (43-56). Los estudios de asociación genética, por su parte, han descrito algunos genes de riesgo entre los que se encuentran proteínas clave de los sistemas de neurotransmisión serotoninérgico, dopaminérgico, noradrenérgico o gabaérgico (receptores de serotonina, especialmente 5HT_{2A}, 5HT_{2C} y 5HT_{1A}, transportador de serotonina y receptores de dopamina, en especial, DRD3 y DRD4) y en genes implicados en la metabolización de los neurotransmisores de estos sistemas (como el gen de la tirosina hidroxilasa, TH; el de la monoamino-oxidasa A, MAOA; o el de la catecol-O-metil transferasa, COMT) (57).

Gen del receptor de serotonina 5HT_{2A}

El gen del receptor 5HT_{2A} (gen HTR2A) se localiza en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14-21) e incluye cuatro exones y dos intrones que completan una secuencia total de 63 kilobases. Presenta dos promotores alternativos con un elemento silenciador aguas abajo del segundo promotor y cuatro sitios de iniciación de la transcripción (58).

El gen HTR2A codifica para una proteína de 471 aminoácidos receptora de moléculas de serotonina y localizada en la membrana postsináptica. Los receptores 2A pertenecen al tipo de receptores acoplados a proteína G, que están a su vez ligadas al metabolismo de los fosfoinositoles. Todos ellos presentan una morfología similar, con siete dominios transmembrana. La unión con serotonina activa los receptores tipo 5HT_{2A} que, a su vez, estimulan vías de transducción de señal, a través de segundos mensajeros y fosfolipasa C, que regularán diferentes procesos celulares.

Algunos autores han descrito una asociación entre el receptor 5HT_{2A} y la depresión (59, 60). Este receptor ha sido también asociado a la ideación y el comportamiento suicida en pacientes depresivos (61, 62). Sin embargo, estos hallazgos no han sido replicados de forma concluyente debido, quizá, al uso de diferentes metodologías y definiciones de fenotipo (tipo de comportamiento suicida que se explora: suicidas consumados, ideación de suicidio, etc), al efecto del tratamiento prolongado con antidepresivos en la densidad de receptores 5HT_{2A} en el cerebro, o al efecto en los estudios postmortem de confusores como el intervalo post-mortem o el estado de agonía previo a la muerte (63).

Numerosos polimorfismos han sido descritos en el gen del receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} (aproximadamente 299 SNPs). De éstos, muchos podrían estar en desequilibrio de ligamiento con la variante causante de la susceptibilidad a la enfermedad o directamente influir en la eficiencia transcripcional del gen, la estabilidad de su RNA o en mecanismos de regulación postranscripcional, como la edición del RNA o el splicing alternativo. Sin

embargo, hasta ahora la mayoría de las investigaciones se han centrado en sólo dos de estos polimorfismos: el SNP 102T/C (rs6313), localizado en el exón 1 del gen (implica un cambio de una timina por una citosina que no provoca cambio en el aminoácido correspondiente) y una zona de variabilidad situada cerca del promotor, en la posición -1438, que consiste en un cambio de una adenina por una guanina (-1438A/G o rs6311).

Algunos trabajos han descrito una relación entre el polimorfismo 102 T/C y la estacionalidad en el curso de la enfermedad (64, 65).

Los hallazgos respecto al polimorfismo -1438 A/G han sido hasta el momento contradictorios. Existen trabajos en los que se ha descrito un efecto del polimorfismo -1438 A/G sobre la eficiencia transcripcional del gen (66-68) y, sin embargo, otros autores no han podido replicar estos resultados (69-71).

Existen estudios que describen una asociación del polimorfismo -1438 (A/G) con depresión (60, 72, 73) pero, de nuevo, los hallazgos no son del todo concluyentes (74, 75).

Véase la Tabla 1 para una revisión de los principales estudios de asociación entre el gen HTR2A y depresión o comportamiento suicida. Quizás, la no replicación de resultados haya tenido mucho que ver el tamaño de las muestras analizadas en los distintos estudios, insuficiente en muchos de los casos para que proporcione el poder estadístico necesario para detectar el efecto del gen, o la heterogeneidad que presentan algunas muestras (91). En otras ocasiones, existen diferencias en la definición del fenotipo, o en los criterios diagnósticos utilizados entre los diferentes estudios de asociación (92, 93), o hay una coexistencia con otros trastornos psiquiátricos, o bien, no se ha tenido en cuenta en el análisis de los datos el efecto de posibles factores confusores, como pueden ser el sexo o la edad, entre otros.

Por último, hay que destacar la ausencia de estudios haplotípicos, en los que distintos marcadores a lo largo del gen son analizados en bloque, conjuntamente, aumentando así la sensibilidad para detectar efectos, si éstos realmente existen.

Dada la importancia del receptor HTR2A en la neurotransmisión serotoninérgica y su posible papel en la etiología de la depresión, se hace necesario explorar más en profundidad la relación entre la variabilidad genética descrita en dicho gen y un posible riesgo incrementado para depresión.

El presente estudio se desarrolló sobre una amplia muestra de individuos, muy bien caracterizada sociodemográfica y clínicamente, en la que se estudiaron seis marcadores del gen HTR2A no sólo de forma individual, sino también mediante un análisis haplotípico.

Tabla 1: Principales estudios de asociación de SNPs localizados en el gen HTR2A en depresión y comportamiento suicida.

REFERENCIA	MUESTRA	POLIMORFISMO	RESULTADOS
HTR2A Y DEPRESIÓN			
Illi <i>et al</i> , 2009 (74)	86 pacientes con depresión mayor y 395 controles	102 C/T (rs6313) 143 8A>G (rs6311) rs7997012	No encuentran asociación de ninguno de los polimorfismos del gen 5HT2A con depresión
Shaikh <i>et al</i> , 2008 (76)	203 adultos con depresión mayor o bipolar de comienzo en la infancia. 199 controles	102 C/T (rs6313)	No asociación con depresión.
Christiansen, L <i>et al</i> , 2007 (72)	684 gemelos (230 ? y 454?) seguidos durante 12 años y a los que se les midió depresión en 5 tiempos. Todos > 70 años.	143 8A>G (rs6311) 452 C/T (rs6314)	El alelo A del polimorfismo -1438 A>G se asoció a depresión y esta asociación es independiente del genotipo para el polimorfismo 452 C/T.
Choi MJ <i>et al</i> , 2004 (60)	189 pacientes con depresión mayor y 148 controles.	-1438A>G (rs6311)	Describen riesgos incrementados para depresión en portadores del alelo G.
Eley TC <i>et al</i> , 2004 (59)	377 adolescentes con puntuaciones >12 o <3 Short form of the Mood and Feeling Questionary (SMFQ)	102 C/T (rs6313)	Asociación del alelo C con depresión.
Oswald P <i>et al</i> , 2003 (77)	142 controles y 142 con depresión mayor	102 C/T (rs6313)	No asociación con depresión.
Jansson M <i>et al</i> , 2003 (73)	377 pacientes con depresión mayor y 1215 controles todos ancianos	-1438 A/G (rs6311)	Encuentran asociación entre el genotipo A/A y depresión, pero al analizar por sexo, solo se mantuvo la asociación en hombres; también en hombres se encontró una tendencia a la asociación con depresión con el genotipo A/G. Podría haber un efecto dosis dependiente del alelo A en hombres ancianos para conferir riesgo a depresión.
Minov C <i>et al</i> , 2001 (78)	173 pacientes deprimidos y 121 controles	102 C/T (rs6313) His452Tyr	No asociación con depresión. Describen asociación del alelo C del polimorfismo rs6313 con mejor respuesta a antidepressivos.
Ohara K <i>et al</i> , 1998 (75)	95 pacientes con trastornos afectivos y 106 controles	-1438 A/G (rs6311)	No asociación con depresión.
Zhang H <i>et al</i> , 1997 (79)	71 sujetos deprimidos, 31 bipolares y 150 controles.	102 C/T (rs6313)	No asociación con depresión. No se encontraron diferencias significativas dentro del grupo de los pacientes con MD en cuanto a historia familiar ni a recurrencia de la enfermedad. Si hallaron diferencias en la edad de inicio del trastorno depresivo y en la historia personal de intentos de suicidio.
HTR2A Y SUICIDIO			
Yoon <i>et al</i> , 2008 (80)	191 pacientes con depresión e intentos de suicidio y 193 controles	102 C/T (rs6313)	No describen asociación con suicidio ni con letalidad.
De Luca V <i>et al</i> , 2007 (81)	35 individuos con esquizofrenia; 35 con t. bipolar y 10 víctimas suicidas.	C102T(rs6313)	El alelo C se asocia a una menor expresión del gen HTR2A que parece estar asociada a comportamiento suicida en psicosis.
Videtic A <i>et al</i> , 2006 (82)	226 víctimas suicidas 225 controles	C-1420T	Hay una tendencia a la asociación con C-1420T del HTR2A, estando el genotipo T/T solo presente en casos, pero esta asociación no es significativa.
Arias B <i>et al</i> , 2001 (61)	159 pacientes con depresión e intentos de suicidio y 164 controles.	102 C/T (rs6313)	Describen diferencias en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre suicidas y no suicidas. Describen riesgos incrementados para el comportamiento suicida en los portadores del alelo 102C.
Crawford J <i>et al</i> , 2000 (83)	68 víctimas suicidas y 95 controles	102 C/T (rs6313)	No describen asociación con suicidio.
Bondy B <i>et al</i> , 2000 (84)	84 pacientes con depresión mayor, 131 víctimas suicidas y 125 controles.	102 C/T (rs6313)	No encuentran asociación entre este polimorfismo e ideación o comportamiento suicida.
Preuss UW <i>et al</i> , 2000 (85)	150 pacientes alcohólicos y 117 controles	102 C/T (rs6313)	No describen asociación con suicidio.
Du L <i>et al</i> , 2000 (62)	120 pacientes con depresión mayor y 131 controles.	102 C/T (rs6313)	Asociación del alelo C con depresión mayor, particularmente en pacientes con ideación suicida. Entre los pacientes con ideación suicida eran más frecuentes los que tenían el genotipo CC.

HTR2A Y EXPRESIÓN GÉNICA

Myers RL <i>et al</i> , 2007 (86)	156 individuos caucásicos, afroamericanos, asiáticos e hispanos.	-1438A/G(rs6311) T102C(rs6313) -1420 C/T. -783 A/G	Los polimorfismos -1438 A/G y -783 A/G se encuentran en desequilibrio de ligamiento. El genotipo A/A del polimorfismo -1438A>G se asocia a una mayor expresión del gen en comparación con el genotipo G/G y el genotipo G/G da lugar a una mayor expresión del gen que A/G. El efecto de este SNP sobre la actividad del gen es un efecto heterocigoto, ie, el genotipo A/G minimiza la expresión génica. En el análisis haplotípico, no se encontraron diferencias en la actividad del promotor entre las posibles combinaciones haplotípicas formadas por los polimorfismos -1438 A>G y -738A/G, salvo para cuando el alelo G de -1438 se encontraba presente junto con el alelo G de -783, en cuyo caso se encontró un descenso de la actividad promotora del gen (GG-1438_GG-738 o AG-1438_AG-738 o GG-1438_AG-738 o AG-1438_GG-738).
Fukuda Y <i>et al</i> , 2006 (66)	Tejido postmortem de corteza cerebral de 31 pacientes con esquizofrenia y heterocigotos para C102T. Linfocitos periféricos de controles	T102C(rs6313)	El alelo C se expresa menos que el T en tejido cerebral (expresión bialélica). En sangre, hay una expresión monoalélica polimórfica. La expresión monoalélica polimórfica encontrada en sangre no es debida a la existencia de impronta
Polesskaya OO <i>et al</i> , 2006 (67)	Tejido humano cerebral de 10 controles y leucocitos periféricos de 18 controles	102 C/T (rs6313)	La metilación aleloespecífica del DNA a nivel del polimorfismo 102 C/T se asocia con diferencias en la expresión del gen 5HT2A.
Parson <i>et al</i> , 2004 (68)	Cultivos celulares de neuroblastoma y adenocarcinoma	-1438 A/G (rs6311) 102 T/C (rs6313)	El alelo A del polimorfismo -1438A>G se asocia a una elevada actividad del promotor. Este SNP podría modular la actividad del gen 5HT2A
Bray NJ <i>et al</i> , 2004 (69)	Tejido postmortem de corteza frontal, parietal y temporal de 50 individuos sanos.	-1438 A/G (rs6311) 102T/C (rs6313)	No encuentran diferencias alélicas en la expresión del gen. Se excluye un efecto epigenético de -1438 A/G sobre 102T/C.
López-Figueroa AL <i>et al</i> , 2004 (70)	Tejido cerebral postmortem de 15 individuos con esquizofrenia, 15 con trastorno bipolar, 15 con depresión y 15 controles sanos.	Niveles de mRNA del HTR2A	No hay diferencias en los niveles de expresión del gen entre los deprimidos y los controles. Los sujetos con trastorno bipolar y los que tenían esquizofrenia sí tienen una menor expresión del HTR2A que los controles en hipocampo.
Spurlock G <i>et al</i> , 1998 (71)	4 familias con un hijo afectado de esquizofrenia, 25 familias con 2 hijos afectados y 3 familias con 3 hijos afectados.	102 C/T (rs6313) Describen el polimorfismo -1438A>G (rs6311)	No encuentran diferencias en la probabilidad de transmisión de un alelo del 102 C/T entre madres y padres heterocigotos. Describen un nuevo polimorfismo (-1438A/G): Está en desequilibrio de ligamiento con el marcador 102 C/T (rs6313). No encuentran diferencias en la actividad basal del receptor entre el alelo G y el A del nuevo polimorfismo -1438A/G.

REVISIONES

Norton & Owen, 2005 (63)	103 estudios con suicidio, depresion	-1438 A/G (rs6311) 102 T/C (rs6313)	El alelo C del marcador T102 C se asocia con una menor expresión génica del gen 5HT2A y alelo A del polimorfismo -1438 A/G con una mayor expresión génica, aunque estos resultados no se han replicado. Asociación entre T102C y depresión pero no con -1438 A/G ni con His452Tyr. Se ha asociado el 102 C con ideación suicida en pacientes deprimidos, pero sin repeticiones. Descenso de la unión de serotonina al HTR2A en corteza prefrontal de suicidas vs. controles. La mayoría de los estudios apuntan hacia un aumento de receptores 2A en la corteza prefrontal dorsolateral de suicidas. En hipocampo la mayoría de los estudios detectan una descenso de receptores 2A en suicidas. Mayor unión a los receptores 2A en corteza prefrontal de suicidas. El alelo C se ha asociado con suicidio, aunque con resultados no concluyentes
Stockmeier CA <i>et al</i> , 2003 (87)	Estudios de imagen en tejido postmortem de suicidas deprimidos y controles		
Roy A <i>et al</i> , 2001 (88)	Estudios con suicidio	102 T/C (rs6313)	

META-ANÁLISIS 5-HT2A Y DEPRESIÓN

Angelova M <i>et al</i> , 2003 (89)	86 estudios de asociación	-1438 A/G (rs6311) 102 T/C (rs6313) His452Tyr	La mayoría de estudios no muestran una asociación entre depresión mayor y ninguno de los marcadores del gen HTR2A estudiados. Solo se han estudiado los SNPs 102C/T y -1438A/G y quizá otros marcadores sí que estén implicados.
-------------------------------------	---------------------------	---	--

META-ANÁLISIS 5-HT2A Y SUICIDIO

Angelova M <i>et al</i> , 2003 (90)	26 estudios de asociación.	-1438 A/G (rs6311) 102 T/C (rs6313) His452Tyr	Solo el marcador 102T/C HTR2A tiene suficiente número de estudios como para que se pueda realizar un meta-análisis. Tras realizar el meta-análisis (596 intentos de suicidio y suicidios consumados vs. 1003 controles) no se encontró asociación. Los resultados no cambiaron cuando se excluyó los estudios sobre población asiática.
-------------------------------------	----------------------------	---	---

Resultados

Un total de 918 individuos componen nuestra muestra. De ellos, el 70,8% son mujeres y el 39,2% hombres.

En la Tabla 2 se muestran algunas de las variables sociodemográficas y clínicas de la muestra.

Tabla 2. Distribución de las variables sociodemográficas y clínicas de la muestra de pacientes (criterios CIE-10 de episodio depresivo severo) y controles.

VARIABLES	PACIENTES N=251	CONTROLES N=667
SEXO	210♀ : 41♂ (83.66%) (16.34%)	440♀ : 227♂ (65.96%) (34.04%)
EDAD MEDIA	48.34 (14.506)	50.76 (15.733)
GRUPO ÉTNICO	98.8% Caucasoide	98.4% Caucasoide
ESTADO CIVIL		
-Casado/Pareja	167 (66.55%)	483 (72.43%)
-Separado/Divorciado	25 (9.96%)	28 (4.19%)
-Viudo	20 (7.96%)	51 (7.64%)
-Soltero	39 (15.53%)	105 (15.74%)
NIVEL ACADÉMICO		
-Doctorado/Licenciado	11 (4.38%)	44 (6.60%)
-Diplomado	13 (5.17%)	56 (8.40%)
-Secundaria (bachiller, COU,FP2)	49 (19.52%)	151 (22.64%)
-Primaria (EGB, 8º, ESO, FP1)	99 (39.46%)	277 (41.53%)
-Sin estudios/Analfabetos	79 (31.47%)	139 (20.83%)
EPISODIO DEPRESIVO SEVERO (CIE-10)	251 (27.34%)	667 (72.66%)
SUICIDIO EN EL TOTAL DE LA MUESTRA	73 (7.95%)	845 (92.05%)
SUICIDIO EN EL GRUPO CON Ep. DEPRESIVO SEVERO	72 (28.80%)	178 (71.2%)

Aproximadamente el 27% del total de la muestra (251 individuos) cumplieron criterios CIE-10 de depresión grave y un 8% tenían ideación o comportamiento suicida (N = 73). Casi todos los individuos con rasgos suicidas tenían depresión grave (N = 72) y representaban aproximadamente el 29% de todos los sujetos con esta forma de depresión.

Para todos los marcadores analizados, la distribución de las frecuencias genotípicas se ajustó al equilibrio Hardy-Weinberg, tanto en enfermos como en controles.

Análisis de asociación genética

En la Tabla 3 se muestra la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de los marcadores polimórficos del gen HTR2A analizados en los individuos deprimidos y en los controles.

Tabla 3. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre los casos (individuos con criterios CIE-10 de episodio depresivo severo) y los controles

MARCADOR	PACIENTES	CONTROLES	p-value	MARCADOR	PACIENTES	CONTROLES	p-value
rs12863574				rs6313			
A	69,34	68,39		C	54,47	54,15	
G	30,66	31,61	0.879	T	45,33	45,85	0.999
AA	48,6	46,8		CC	27,2	29,3	
AG	41,6	43,1		TC	54,5	49,6	
GG	9,9	10	0.897	TT	18,3	21,0	0.413
rs2770296				rs6314			
T	69,23	69,65		T	18,73	20,99	
C	30,77	30,35	0.878	C	81,27	79,01	0.724
TT	47,4	50,0		TT	4,8	6,9	
TC	43,7	39,3		TC	27,9	28,2	
CC	8,9	10,7	0.430	CC	67,3	64,9	0.482
rs6311				rs985933			
G	54,8	54,3		A	40,24	40,39	
A	45,2	45,7	0.887	G	59,76	59,61	0.999
GG	27,5	29,3		AA	15,5	16,5	
GA	54,5	49,9		AG	49,4	47,7	
AA	18,0	20,8	0.452	GG	35,1	35,7	0.889

En primer lugar, analizamos la posible asociación entre cada uno de los seis marcadores contenidos en el gen HTR2A y la depresión grave. Como puede desprenderse de la Tabla 3, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias alélicas ni genotípicas para ninguno de los marcadores analizados al comparar casos y controles.

De manera análoga y en segundo lugar, exploramos las posibles relaciones de asociación entre cada marcador génico e ideación o comportamiento suicida en el total de la muestra. De nuevo, ninguno de los seis marcadores analizados parecía conferir riesgos incrementados para este rasgo (ver Figura: 3.a).

Por último, quisimos explorar si el gen HTR2A ejercía un efecto de riesgo para ideación y comportamiento suicida sólo en aquellos individuos deprimidos graves. Para ello, llevamos a cabo un análisis intragrupal en el que, considerando sólo el grupo de individuos con episodio depresivo grave (n=251), comparamos aquéllos que tenían, además, ideación o comportamiento suicida frente a los individuos deprimidos que nunca habían tenido tales ideas o comportamientos. En este caso, tampoco se detectó ningún efecto de riesgo conferido por ninguno de los marcadores genéticos analizados (Figura 3.b).

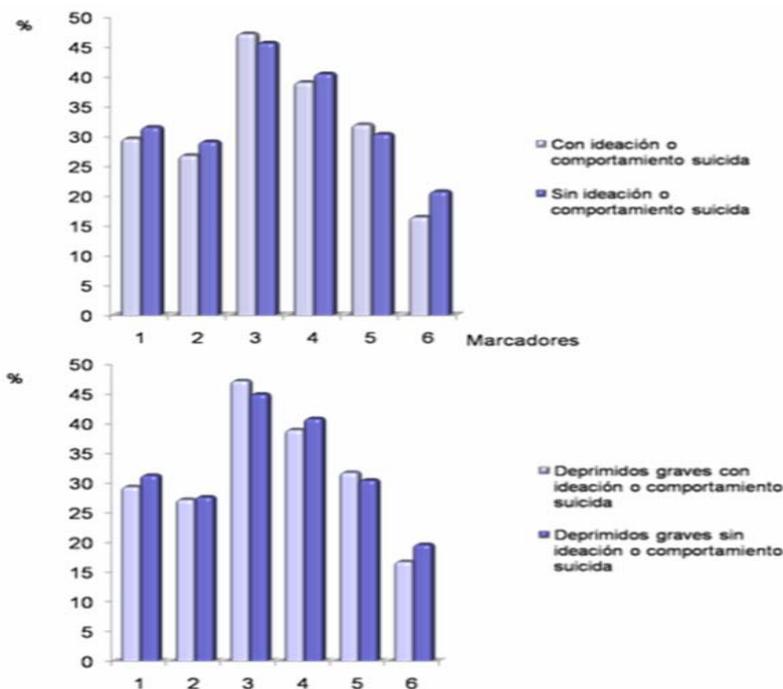


Figura 3. Distribución de frecuencias del alelo menos frecuente de cada uno de los marcadores del gen HTR2A analizados para suicidio.

Pvalue > 0.05 en todos los casos.

Figura 3.A. Análisis realizado en el total de la muestra.

Figura 3.B. Análisis realizados en el grupo de los deprimidos graves.

En las Figuras 4 y 5 se representan los riesgos relativos (valores de Odds Ratio con intervalos de confianza del 95%) conferidos por cada uno de los marcadores génicos analizados para ideación o comportamiento suicida, tanto en el total de la muestra como en el grupo de pacientes con depresión grave.

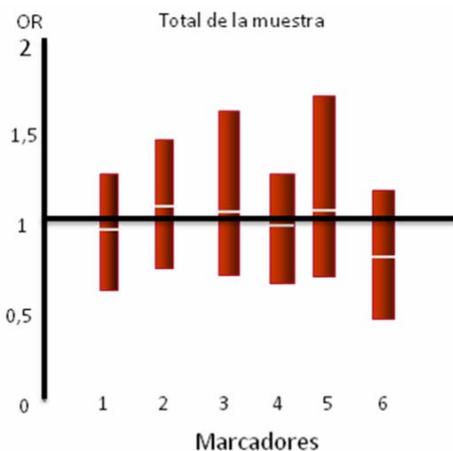


Figura 4. Riesgos relativos conferidos para suicidio en el total de la muestra por cada uno de los marcadores del HTR2A analizados. Ninguno de ellos confiere un riesgo significativo.

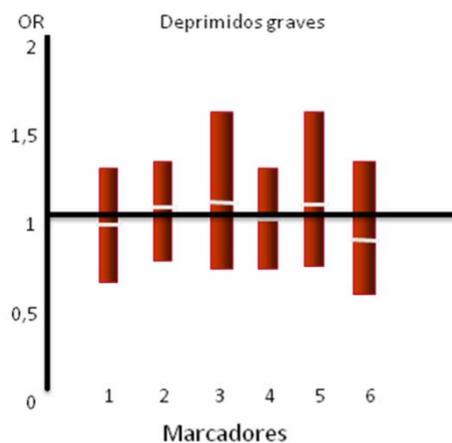


Figura 5. Riesgos relativos conferidos para suicidio en pacientes deprimidos graves por cada uno de los marcadores del HTR2A analizados. Ninguno de ellos confiere un riesgo significativo

Análisis haplotípico

Tras el análisis marcador a marcador, llevamos a cabo un análisis haplotípico.

En la Tabla 4 se describen los valores de D' y r^2 resultantes de ese análisis, y en la Figura 6 se muestran gráficamente las relaciones de desequilibrio de ligamiento de los seis marcadores estudiados en el gen HTR2A.

Tabla 4. Valores de D' y r^2 para todas las combinaciones de los seis SNP analizados a lo largo del gen HTR2A.

	rs12863574 (1)	rs6311 (2)	rs6313 (3)	rs985933 (4)	rs2770296 (5)	rs6314 (6)
rs12863574 (1)						
rs6311 (2)	$D'=0,993$ $R^2=0,3845$					
rs6313 (3)	$D'=0,993$ $R^2=0,3887$	$D'=1$ $R^2=0,9969$				
rs985933 (4)	$D'=0,2478$ $R^2=0,0417$	$D'=0,9472$ $R^2=0,5112$	$D'=0,9462$ $R^2=0,5106$			
rs2770296 (5)	$D'=0,1876$ $R^2=0,03392$	$D'=0,9569$ $R^2=0,3425$	$D'=0,9567$ $R^2=0,3441$	$D'=0,9629$ $R^2=0,6104$		
rs6314 (6)	$D'=0,8482$ $R^2=0,08848$	$D'=0,7134$ $R^2=0,1597$	$D'=0,7142$ $R^2=0,1643$	$D'=0,6025$ $R^2=0,6546$	$D'=0,4879$ $R^2=0,02813$	

Se identificaron dos bloques haplotípicos en la muestra. Uno formado por los marcadores rs6311-rs6313 y otro formado por rs6313-rs985933-rs2770296 (Figura 6).

Tras analizar si existían diferencias en la distribución de las frecuencias haplotípicas para cada uno de los bloques identificados entre los pacientes con episodio depresivo grave y los controles, nuestros resultados mostraron que tales diferencias no eran estadísticamente significativas, tal como se muestra en la Tabla 5.

Tampoco se encontraron diferencias entre casos y controles al analizar cualquiera de las otras posibles combinaciones haplotípicas resultantes de agrupar los marcadores dos a dos, tres a tres, cuatro a cuatro, cinco a cinco o en un bloque de 6 (resultados no mostrados).

Análogamente, desarrollamos un nuevo análisis haplotípico para testar la posible asociación entre el gen HTR2A y la ideación y comportamiento suicidas, tanto en la muestra total como dentro del grupo de individuos con episodio depresivo grave. De nuevo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados (Ver Tabla 6).

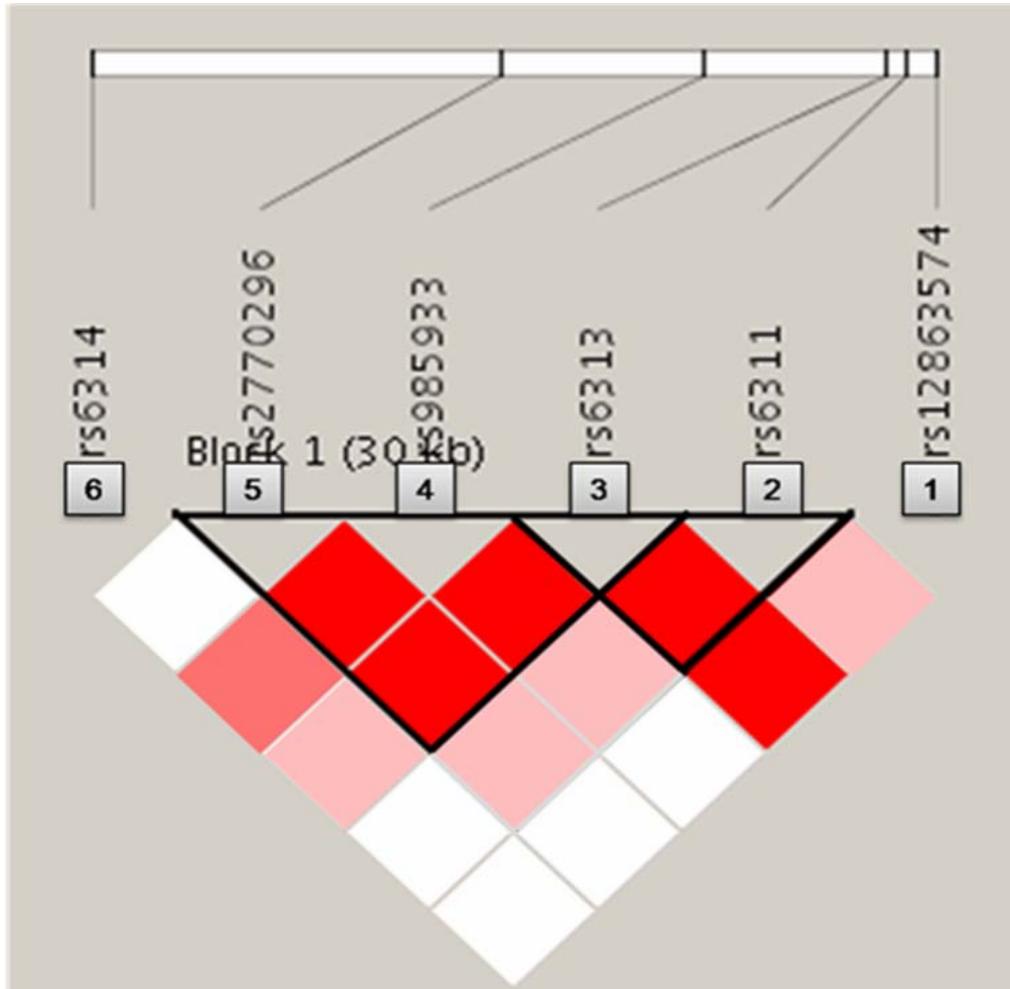


Figura 6. Representación gráfica de los bloques haplotípicos descritos en la muestra.
 Las relaciones de ligamento entre los marcadores se representan en rojo. La intensidad del color indica el grado de disequilibrio existente entre ellos.

Tabla 5. Frecuencias haplotípicas para los haplotipos más comúnmente representados en la muestra de los bloques rs6311-rs6313 y rs6313-rs985933-rs2770296. Comparación entre individuos deprimidos graves y controles.

	DEPRIMIDOS GRAVES (N=251)	CONTROLES (N=667)
Bloque rs6311-rs6313		
G-C	54,5%	54,16%
A-T	45,1%	45,76%
p-value = 0,3605		
Bloque rs6313-rs985933-rs2770296		
C-G-T	14,22%	14,25%
C-A-T	9,8%	9,8%
C-A-C	29,62%	29,62%
T-G-T	45,19%	45,06%
p-value = 0,9846		

Tabla 6. Frecuencias haplotípicas para los haplotipos más comúnmente representados en nuestra muestra de los bloques rs6311-rs6313 y rs6313-rs985933-rs2770296. Comparación entre los individuos con ideación o comportamiento suicida y los no suicidas y entre los pacientes deprimidos suicidas y los deprimidos sin esta característica.

	SUICIDAS (N=73)	NO SUICIDAS (N=844)	DEPRIMIDOS SUICIDAS (N=72)	DEPRIMIDOS NO SUICIDAS (N=178)
Bloque rs6311-rs6313				
G-C	52,86%	54,37%	52,9%	55,11%
A-T	47,14%	45,45%	44,32%	44,32%
	p-value = 0,7318		p-value = 0,4535	
Bloque rs6313-rs985933-rs2770296				
C-G-T	12,08%	14,43%	12,25%	15,1%
C-A-T	8,6%	9,9%	8,76%	10,23%
C-A-C	30,65%	29,15%	30,37%	29,08%
T-G-T	47,86%	44,84%	47,83%	43,94%
	p-value = 0,8482		p-value = 0,8623	

Discusión

En la actualidad, la existencia de una alteración en las vías de neurotransmisión monoaminérgicas, principalmente de serotonina, sigue siendo una de las hipótesis etiológicas más aceptadas en la etiología de la depresión. Sin embargo, se desconocen todavía los mecanismos fisiopatológicos últimos desencadenantes de un episodio depresivo.

Los estudios de familia, gemelos y adopción demuestran que la depresión es en parte heredable, y proponen la existencia de genes de riesgo, probablemente muchos y de efecto menor, que predispondrían a padecer la enfermedad. Numerosas investigaciones se han centrado en el análisis de la variabilidad de genes candidatos para la depresión, entre los que se encuentran, sobre todo, genes que codifican para proteínas clave del sistema de neurotransmisión serotoninérgico.

Los resultados en torno al gen SERT (transportador de serotonina) parecen, hasta ahora, los más robustos y concluyentes (94).

Otro de los genes interesantes en depresión es el gen HTR2A, que ha sido asociado a depresión (59, 60, 72, 73) y, sobre todo, a características clínicas de la misma, tales como la estacionalidad (64, 65) o la ideación y el comportamiento suicidas (61, 62), aunque tales hallazgos no han sido replicados en todos los casos (74-85).

Teniendo en cuenta los hallazgos previos que parecen relacionar el gen HTR2A con la etiología de la depresión o con algunas características subclínicas de la misma y dada la importancia del receptor 5-HT_{2A} dentro de la vía de neurotransmisión serotoninérgica, se hace necesario desarrollar nuevos estudios sobre muestras más amplias, en las que exista una definición más homogénea de “caso” y donde se analice de forma más profunda la variabilidad contenida en el gen HTR2A, explorando un mayor número de SNPs y llevando a cabo análisis haplotípicos. El fin de estos nuevos estudios sería confirmar o

definitivamente rechazar la existencia de una asociación genética entre el gen HTR2A y la enfermedad o entre el gen y la ideación o comportamiento suicidas.

Es bien sabido que el análisis haplotípico puede aumentar el poder para detectar un efecto genético en el fenotipo, si éste realmente existe, al considerar la variación de todo un segmento de ADN haploide en lugar de una única localización puntual. De ahí que se haya puesto verdadero empeño en desarrollar a nivel mundial el proyecto HapMap, encaminado a identificar los distintos bloques haplotípicos y sus tag SNPs en distintos grupos poblacionales (95).

El objetivo del presente estudio fue explorar la posible implicación del gen HTR2A en el origen de la depresión.

Nuestros resultados desvelaron, en primer lugar, que la distribución de frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas no difería significativamente al comparar individuos deprimidos graves y controles. Nuestros datos vendrían a apoyar, por tanto, los descritos por otros autores en estudios previos (74, 76-79), en los que no se encuentran evidencias que apoyen un posible papel del gen HTR2A en el origen de la depresión.

El estudio fue desarrollado sobre una amplísima muestra de individuos (N=918; 251 casos y 667 controles), lo cual nos aseguraba un 80% de poder con el 95% de intervalo de confianza de detectar efectos pequeños, de OR=1.5 o superiores. Este cálculo de poder se realizó teniendo en cuenta la frecuencia del alelo de riesgo del polimorfismo más estudiado en el gen HTR2A en relación a la depresión, el polimorfismo rs6313.

La muestra que analizamos, además de ser grande, tenía la particularidad de proceder de atención primaria. Se trataba de individuos de la comunidad. Esto es una ventaja del diseño, puesto que muchos de los estudios realizados hasta ahora han utilizado muestras procedentes de pacientes hospitalarios, en las que están representadas sólo las formas más graves de la enfermedad de interés y los resultados son difícilmente extrapolables a la población general.

Los estudios publicados hasta el momento sobre el gen HTR2A y depresión han evaluado la variabilidad contenida en dicho gen centrandose su análisis en dos marcadores: el rs6313 y el rs6311, ambos en completo desequilibrio de ligamiento. En nuestro trabajo, se exploró la variabilidad del gen HTR2A de un modo más amplio, analizando seis polimorfismos contenidos a todo lo largo de su secuencia, consiguiéndose así un efecto de barrido en el examen de la variabilidad presente en este gen y su relación con la depresión. Estos marcadores, tal y como se detalla en el apartado de material y métodos, fueron seleccionados a priori atendiendo a criterios de funcionalidad, heterocigosidad y localización cromosómica. Se analizaron de forma independiente y haplotípica.

En nuestros análisis fuimos muy restrictivos en el diagnóstico de depresión debido a que pretendíamos definir claramente el fenotipo depresivo para determinar si realmente existía un efecto del gen. Es por ello que en nuestros análisis tuvimos en cuenta sólo los individuos con episodio depresivo grave, ya que constituirían un grupo más homogéneo para la enfermedad.

En el presente trabajo se exploró además, el posible papel que la variabilidad contenida en el gen HTR2A podría tener en aspectos de la expresión clínica del episodio depresivo, tales como la ideación o el comportamiento suicidas.

Algunos investigadores sugieren que este comportamiento suicida estaría, en parte, modulado por factores genéticos (96). Dentro de los posibles genes candidatos para el suicidio, el gen HTR2A podría ser clave, ya que distintos autores han descrito densidades incrementadas del receptor 5-HT_{2A} en plaquetas de suicidas y en zonas del cerebro de individuos que habían cometido suicidio (21, 97). Incluso algunos autores han descrito una asociación positiva entre el polimorfismo rs6313 de este gen y el comportamiento suicida (61, 62). Nuestros resultados, sin embargo, no apoyan la existencia de asociación entre ninguno de los seis marcadores analizados (entre ellos el marcador rs6313) y este aspecto de la enfermedad, tanto en el total de la muestra, como en el subgrupo de individuos deprimidos graves. Incluso al explorar mediante un análisis haplotípico el posible efecto en bloque de estos marcadores sobre la ideación o el comportamiento suicidas, no encontramos ningún efecto significativo de este gen. Tales hallazgos apoyan los resultados derivados de algunos estudios previos (80, 83-85).

Uno de los posibles motivos de discrepancia entre los hallazgos que reportan unos y otros autores puede haber sido la propia definición de "caso". En los trabajos de *Arias et.al 2001* (61) y *Du et.al 2000* (62), los dos únicos estudios en los que se describe una asociación entre el gen HTR2A y suicidio, la evaluación de la ideación y comportamiento suicidas se realizó usando una de las preguntas de la escala de Hamilton para depresión (HDRS) (98). Esta escala incluye un único ítem que valora precisamente la ideación y comportamiento suicidas con una puntuación de cero a cuatro. Esta escala es menos precisa y restrictiva, quizás, que los ítems dedicados a este aspecto en la Entrevista Diagnóstica Compuesta Internacional (CIDI) (99), que fue la herramienta utilizada en nuestro estudio. En cualquier caso, nuestros resultados van a favor de los que no encuentran asociación entre el gen HTR2A y suicidio, incluidos aquéllos que han sido realizados sobre víctimas suicidas (83, 84).

Conclusiones

En conclusión, nuestros resultados indican que la variación contenida en el gen del receptor de serotonina 5-HT_{2A} no parece tener un efecto importante en la etiología de la depresión. Asimismo, este gen tampoco parece conferir riesgos incrementados para la ideación o el comportamiento suicida, ni en la muestra total ni dentro del grupo de pacientes depresivos.

Métodos

Contexto del estudio

El trabajo que se presenta a continuación se ha desarrollado en el contexto del estudio PREDICT-GENE, que consiste en un estudio de seguimiento longitudinal a tres años de una cohorte de individuos usuarios de los servicios de atención primaria de distintos centros de salud del país con el objetivo de establecer perfiles genéticos de vulnerabilidad a depresión e identificar posibles interacciones entre factores genéticos y ambientales determinantes de la aparición prospectiva de episodios depresivos (1).

Insertado en este estudio de cohorte hemos desarrollado un estudio de asociación genética según un diseño caso-control, teniendo en cuenta los datos de un primer corte en ese seguimiento (tiempo cero), con el objetivo de valorar si la variabilidad contenida en el gen HTR2A pudiera estar asociada a depresión o a características clínicas de la misma.

El estudio PREDICT-GENE se origina y se enmarca, a su vez, en el contexto de otro estudio, el proyecto PREDICT-D.

El PREDICT-D es un estudio prospectivo de cohorte en el que distintos usuarios de los servicios de atención primaria de seis países europeos participantes fueron reclutados y evaluados en tres ocasiones a lo largo de un año con el objetivo principal de desarrollar un inventario de riesgo multifactorial predictor de la aparición de episodios de depresión que pudiera ser utilizado en el futuro como una herramienta de trabajo que permitiera, por un lado, detectar individuos de alto riesgo para depresión y, por otro, que facilitara la elaboración de estrategias de intervención y prevención (100).

Muestra

Componen nuestra muestra un total de 918 individuos (650 mujeres y 268 hombres), todos ellos usuarios de los servicios de atención primaria de trece centros de salud de las provincias de Málaga y Granada que fueron invitados a participar en el estudio, siendo previamente informados acerca de los objetivos de éste y de su naturaleza. Aquellas personas que accedieron a participar dieron su consentimiento informado por escrito.

Fueron criterios de exclusión ser mayor de 75 años (debido a la alta prevalencia de trastornos cognitivos a partir de esta edad), sufrir una enfermedad terminal, un trastorno mental de naturaleza orgánica, no entender español o ser menor de edad.

Los participantes fueron evaluados para toda una batería de variables sociodemográficas y psicológicas, mediante entrevistas estructuradas y validadas, administradas por entrevistadoras previamente entrenadas (100).

En el presente estudio nos centraremos en las variables sociodemográficas generales y los datos procedentes de la Entrevista Diagnóstica Compuesta Internacional (CIDI) (99) y del Cuestionario General de Salud (GHQ) (101).

La sección de depresión del CIDI permite generar diagnósticos de depresión según criterios CIE-10 y además incluye un apartado en el que se explora la ideación y

comportamiento suicida del individuo. El diagnóstico de episodio depresivo grave y la ideación o comportamiento suicidas fueron nuestras variables resultado.

La versión española de la entrevista GHQ, mide el estado general de salud y descarta enfermedad mental o somática graves. Los individuos controles de nuestra muestra demostraron no padecer depresión y puntuaron en el GHQ por debajo de 7, lo que indica la ausencia de cualquier patología mental o somática grave.

Análisis genéticos

Para el análisis de la variabilidad del gen HTR2A, se seleccionaron seis SNPs distribuidos a lo largo de su secuencia según criterios de:

Funcionalidad: Se priorizaron SNPs que potencialmente pudieran suponer cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína, en la secuencia promotora o en zonas relacionadas con procesos de splicing alternativo. Para ello, se utilizó la herramienta informática pupaSuite (102).

Heterozigosidad: Se seleccionaron aquellos SNPs cuyo alelo menos frecuente tenía una frecuencia poblacional superior al 5%.

Localización en la secuencia génica: se priorizaron tag-SNPs, es decir, se seleccionaron aquellos SNPs que fueran más informativos dentro de cada bloque haplotípico.

Validación: Todos los SNPs escogidos habrían de estar validados.

En la figura 7 se muestran los SNPs del gen HTR2A incluidos en nuestro estudio.

En la Tabla 7 se enumeran los SNPs analizados y se detalla su posición relativa en el

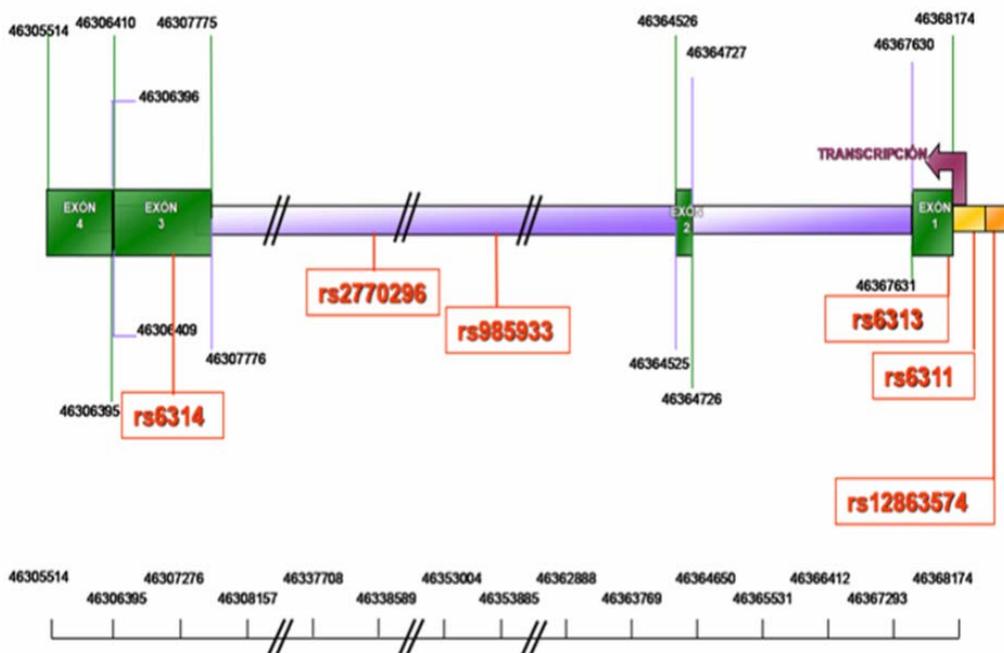


Figura 7. Representación esquemática del gen del receptor de serotonina tipo 2^a y de los SNPs seleccionados para nuestros análisis.

gen HTR2A, heterocigosidad y frecuencias alélicas y genotípicas descritas en población caucasoide según SNPper (103).

Tabla 7

Descripción, según SNPper, de los seis SNPs del gen HTR2A seleccionados para su análisis en el presente trabajo.

NCBI ID	Nº	POSICIÓN RELATIVA	VARIACIÓN NUCLEÓTIDICA	VARIACIÓN AMINOACÍDICA	HETERO-ZIGOSIDAD	FREQ. ALÉLICAS	FREQ. GENOTÍPICAS
rs12863574	1	-3633	A/G	NO	0.327	A (68%) G (32%)	AA (54%) AG (28%) GG (18%)
rs6311	2	-1438	A/G	NO	0.493	G (55%) A (45%)	GG (32%) GA (47%) AA (21%)
rs6313	3	101	C/T	S 34 S	0.491	C (55%) T (45%)	CC (32%) CT (47%) TT (21%)
rs985933	4	14178	A/G	NO	0.656	G (64%) A (36%)	GG (39%) GA (49%) AA (12%)
rs2770296	5	29481	C/T	NO	0.325	T (73%) C (27%)	TT (53%) TC (40%) CC (7%)
rs6314	6	61007	C/T	H 425 Y	0.133	C (93%) T (8%)	CC (85%) CT (15%)

Los análisis moleculares fueron desarrollados en la plataforma SEQUENOM. Esta técnica consiste en amplificar los fragmentos de ADN que contienen los SNPs de interés mediante una PCR multiplex. A continuación se lleva a cabo la reacción de discriminación alélica a través de una reacción de minisequenciación que genera productos alelo específico, o mediante el uso de terminadores de masa modificada.

Análisis estadístico

El test de la Chi-cuadrado fue utilizado para comprobar que tanto en casos como en controles las frecuencias genotípicas observadas se ajustaban a las esperadas según equilibrio Hardy-Weinberg.

Para el análisis de asociaciones alélicas y genotípicas se usó también el test de la Chi-cuadrado.

Las frecuencias haplotípicas, así como la existencia de desequilibrio de ligamiento entre los distintos marcadores, se estimaron con el programa UNPHASED (v3.0). Ésta es una aplicación informática para llevar a cabo análisis de asociación genética en familias y en sujetos no emparentados. Este programa infiere, con el máximo nivel de verosimilitud, las frecuencias haplotípicas de los marcadores analizados y su principal ventaja es que tiene en cuenta que tales frecuencias son estimadas y no valores absolutos, lo cual hace que este método sea muy conservativo y menos propenso a errores tipo I que otras herramientas informáticas (104).

Contribución de los Autores

Esther Molina, Margarita Rivera y Blanca Gutiérrez han supervisado la recogida de la muestra y han realizado los análisis genéticos y estadísticos. Jorge Cervilla ha dirigido el Proyecto PREDICT-GENE. Francisco Torres-González el nodo español del proyecto PREDICT. Esther Molina y Blanca Gutiérrez han elaborado el presente manuscrito.

Agradecimientos

Agradecemos su colaboración a los profesores Michael King e Irwin Nazareth, de la University Hospital and Royal Free School of Medicine de Londres (Reino Unido), al Instituto de Neurociencias Federico Olóriz, la Sección Departamental de Psiquiatría y Psicología Médica de la Universidad de Granada y del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red (CIBERSAM) Granada, y al resto de investigadores, entrevistadores y participantes de los estudios PREDICT y PREDICT-GENE.

Este trabajo ha sido desarrollado gracias a las siguientes becas y ayudas que han aportado total o parcialmente su presupuesto para el estudio PREDICT-Gene: Beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia (AP2003-3652), Beca del Plan Nacional I+D+I del Ministerio de Educación y Ciencia: Proyecto PREDICT-Gene (SAF 2006-07192), Beca del Plan Propio de la Universidad de Granada (30.PP.5000), Beca de la Comisión Europea, V Programa Marco, Estudio PREDICT (QL4-CT2002-00683), Beca del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2004-01310), Becas Del Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad, Estudio PREDICT-España (PI04/1980, PI0/41771, PI04/2450 y PI06/1442), Grupo Andaluz de Investigación en Salud Mental, Consejería de Innovación, Junta de Andalucía (CTS-322), Centro de Investigaciones Biomédicas en Red (CIBERSAM) Granada e Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad (CIB07/09/0036).

Referencias

1. Cervilla JA, Rivera M, Molina E, et al: **The 5-HTTLPR s/s genotype at the serotonin transporter gene (SLC6A4) increases the risk for depression in a large cohort of primary care attendees: the PREDICT-gene study.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006, **141B**:912-917.
2. King M, Nazareth I, Levy G, et al: **Prevalence of common mental disorders in general practice attendees across Europe.** *British Journal of Psychiatry* 2008, **192**:362-367.
3. Murphy JM, Nierenberg AA, Laird NM, et al: **Incidence of major depression: prediction from subthreshold categories in the Stirling County Study.** *J Affect Disord* 2002, **68**:251-259.
4. Murray CJ, Lopez AD: **Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study.** *Science* 1996, **274**:740-743.
5. Boyce P, Parker G, Barnett B, Cooney M, Smith F: **Personality as a vulnerability factor to depression.** *Br J Psychiatry* 1991, **159**:106-114.
6. Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ: **A longitudinal twin study of personality and major depression in women.** *Arch Gen Psychiatry* 1993, **50**:853-862.
7. Bifulco A, Moran PM, Baines R, Bunn A, Stanford K: **Exploring psychological abuse in childhood: II. Association with other abuse and adult clinical depression.** *Bull Menninger Clin* 2002, **66**:241-258.
8. Gibb BE, Butler AC, Beck JS: **Childhood abuse, depression, and anxiety in adult psychiatric outpatients.** *Depress Anxiety* 2003, **17**:226-228.
9. Harkness KL, Monroe SM: **Childhood adversity and the endogenous versus nonendogenous distinction in women with major depression.** *Am J Psychiatry* 2002, **159**:387-393.
10. Harris T: **Recent developments in understanding the psychosocial aspects of depression.** *Br Med Bull* 2001, **57**:17-32.
11. Kaplow JB, Widom CS: **Age of onset of child maltreatment predicts long-term mental health outcomes.** *J Abnorm Psychol* 2007, **116**:176-187.
12. Kaufman J: **Depressive disorders in maltreated children.** *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1991, **30**:257-265.
13. Kaufman J, Plotsky PM, Nemeroff CB, Charney DS: **Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications.** *Biol Psychiatry* 200, **48**:778-790.
14. Widom CS, DuMont K, Czaja SJ: **A prospective investigation of major depressive disorder and comorbidity in abused and neglected children grown up.** *Arch Gen Psychiatry* 2007, **64**:49-56.
15. Canetti L, Bachar E, Bonne O, et al: **The impact of parental death versus separation from parents on the mental health of Israeli adolescents.** *Compr Psychiatry* 2000, **41**:360-368.
16. Enns MW, Cox BJ, Larsen DK: **Perceptions of parental bonding and symptom severity in adults with depression: mediation by personality dimensions.** *Can J Psychiatry* 2000, **45**:263-268.
17. Enns MW, Cox BJ, Clara I: **Parental bonding and adult psychopathology: results from the US National Comorbidity Survey.** *Psychol Med* 2002, **32**:997-1008.
18. Finlay-Jones R, Brown GW: **Types of stressful life event and the onset of anxiety and depressive disorders.** *Psychol Med* 1981, **11**:803-815.

19. Lloyd C: **Life events and depressive disorder reviewed. II. Events as precipitating factors.** *Arch Gen Psychiatry* 1980, **37**:541-548.
20. Lloyd C: **Life events and depressive disorder reviewed. I. Events as predisposing factors.** *Arch Gen Psychiatry* 1980, **37**:529-535.
21. Arango V, Ernsberger P, Marzuk PM, et al: **Autoradiographic demonstration of increased serotonin 5-HT₂ and beta-adrenergic-receptor binding-sites in the brain of suicide victims.** *Archives of General Psychiatry* 1990, **47**:1038-1047.
22. Axelrod J, Weil-Malherbe H, Tomchick R: **The physiological disposition of H₃-epinephrine and its metabolite metanephrine.** *J Pharmacol Exp Ther* 1959, **127**:251-256.
23. Pitchot W, Hansenne M, Pinto E, Reggers J, Fuchs S, Anseau M: **5-Hydroxytryptamine 1A receptors, major depression, and suicidal behavior.** *Biol Psychiatry* 2005, **58**:854-858.
24. Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, et al: **Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states.** *Science* 2006, **311**:77-80.
25. Young SN, Smith SE, Pihl RO, Ervin FR: **Tryptophan Depletion Causes A Rapid Lowering of Mood in Normal Males.** *Psychopharmacology* 1985, **87**:173-177.
26. Belmaker RH, Agam G: **Major depressive disorder.** *N Engl J Med* 2008, **358**:55-68.
27. Dinan TG: **Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function.** *Life Sci* 1996, **58**:1683-1694.
28. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ: **A molecular and cellular theory of depression.** *Arch Gen Psychiatry* 1997, **54**:597-606.
29. Holsboer F: **Neurobiology of mental illness.** In: *Charney D NEBB, ed. Clinical Neuroendocrinology.* Oxford University Press: New York, 1999: 149-161.
30. Holsboer F: **The corticosteroid receptor hypothesis of depression.** *Neuropsychopharmacology* 2000, **23**:477-501.
31. Linkowski P, Mendlewicz J: **Pruebas endocrinológicas en Psicopatología.** In: *Psiquiatría Biológica.* Ed. Masson: Barcelona, 1990:165-178.
32. Mossner R, Daniel S, Albert D, et al: **Serotonin transporter function is modulated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) but not nerve growth factor (NGF).** *Neurochem Int* 2000, **36**:197-202.
33. Nemeroff CB: **The neurobiology of depression.** *Sci Am* 1998, **278**:42-49.
34. O'Connor TM, O'Halloran DJ, Shanahan F: **The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia.** *QJM* 2000, **93**:323-333.
35. Fañanás L: **Genética de la Depresión.** In: *Depresión.* Fundación Valenciana de Estudios Avanzados, 2002:63-104.
36. Molina, E: **Variabilidad genética y estrés psicosocial previo como determinantes prospectivos de depresión. Análisis longitudinal del estudio Predict-Gene.** Ed. Universidad de Granada: Granada, 2009.
37. Langer SZ: **Presynaptic regulation of the release of catecholamines.** *Pharmacological Reviews* 1980, **32**: 337-362
38. Schildkraut JJ, Cole JO, Rohde WA, Labrie RA, et al: **Toward a biochemical classification of depressive disorders .1. Differences in urinary excretion of MHPG and other catecholamine metabolites in clinically defined subtypes of depressions.** *Arch. Gen. Psychiatry* 1978, **35**:1427-1433
39. Jones I, McGuffin P: **Genetics of Affective Disorders.** In: *Psychiatric Genetics and Genomics.* Oxford University Press, 2002:211-245.

40. Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ: **A population-based twin study of major depression in women. The impact of varying definitions of illness.** *Arch Gen Psychiatry* 1992, **49**:257-266.
41. Kendler KS, Prescott CA: **A population-based twin study of lifetime major depression in men and women.** *Arch Gen Psychiatry* 1999, **56**:39-44.
42. Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS: **Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis.** *Am J Psychiatry* 2000, **157**:1552-1562.
43. Abkevich V, Camp NJ, Hensel CH, et al: **Predisposition locus for major depression at chromosome 12q22-12q23.2.** *Am J Hum Genet* 2003, **73**:1271-1281.
44. Balciuniene J, Yuan QP, Engstrom C, et al: **Linkage analysis of candidate loci in families with recurrent major depression.** *Mol Psychiatry* 1998, **3**:162-168.
45. Camp NJ, Lowry MR, Richards RL, et al: **Genome-wide linkage analyses of extended Utah pedigrees identifies loci that influence recurrent, early-onset major depression and anxiety disorders.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005, **135**:85-93.
46. Fullerton J, Cubin M, Tiwari H, et al: **Linkage analysis of extremely discordant and concordant sibling pairs identifies quantitative-trait loci that influence variation in the human personality trait neuroticism.** *Am J Hum Genet* 2003, **72**:879-890.
47. Holmans P, Zubenko GS, Crowe RR, et al: **Genomewide significant linkage to recurrent, early-onset major depressive disorder on chromosome 15q.** *Am J Hum Genet* 2004, **74**:1154-1167.
48. Kawada Y, Hattori M, Fukuda R, Arai H, et al: **No evidence of linkage or association between tyrosine hydroxylase gene and affective disorder.** *J Affect Disord* 199, **34**:89-94.
49. Lim LC, Gurling H, Curtis D, Brynjolfsson J, et al: **Linkage between tyrosine hydroxylase gene and affective disorder cannot be excluded in two of six pedigrees.** *Am J Med Genet* 1993, **48**:223-228.
50. McGuffin P, Knight J, Breen G, et al: **Whole genome linkage scan of recurrent depressive disorder from the depression network study.** *Hum Mol Genet* 2005, **14**:3337-3345.
51. Nash MW, Huezo-Diaz P, Williamson RJ, et al: **Genome-wide linkage analysis of a composite index of neuroticism and mood-related scales in extreme selected sibships.** *Hum Mol Genet* 2004, **13**:2173-2182.
52. Neale BM, Sullivan PF, Kendler KS: **A genome scan of neuroticism in nicotine dependent smokers.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005, **132**:65-69.
53. Neiswanger K, Zubenko GS, Giles DE, Frank E, et al: **Linkage and association analysis of chromosomal regions containing genes related to neuroendocrine or serotonin function in families with early-onset, recurrent major depression.** *Am J Med Genet* 199, **81**:443-449.
54. Serretti A, Macciardi F, Cusin C, et al: **Linkage of mood disorders with D2, D3 and TH genes: a multicenter study.** *J Affect Disord* 2000, **58**:51-61.
55. Wilson AF, Tanna VL, Winokur G, Elston RC, Hill EM: **Linkage analysis of depression spectrum disease.** *Biol Psychiatry* 1989, **26**:163-175.
56. Zubenko GS, Maher B, Hughes HB, III, et al: **Genome-wide linkage survey for genetic loci that influence the development of depressive disorders in families with recurrent, early-onset, major depression.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003, **123**:1-18.
57. Zhu QS, Chen K, Shih JC: **Characterization of the Human 5-Ht2A Receptor Gene Promoter.** *Journal of Neuroscience* 1995, **15**:4885-4895.

58. Eley TC, Sugden K, Corsico A, et al: **Gene-environment interaction analysis of serotonin system markers with adolescent depression.** *Molecular Psychiatry* 2004, **9**:908-915.
59. Choi MJ, Lee HJ, Lee HJ, et al: **Association between major depressive disorder and the-1438A/G polymorphism of the serotonin 2A receptor gene.** *Neuropsychobiology* 2004, **49**:38-41
60. Arias B, Gasto C, Catalan R, Gutierrez B, et al: **The 5-HT2A receptor gene 102T/C polymorphism is associated with suicidal behavior in depressed patients.** *American Journal of Medical Genetics* 2001, **105**:801-804..
61. Du L, Bakish D, Lapierre YD, Ravindran AV, Hrdina PD: **Association of polymorphism of serotonin 2A receptor gene with suicidal ideation in major depressive disorder.** *Am J Med Genet* 2000, **96**:56-60
62. Norton N, Owen MJ: **HTR2A: Association and expression studies in neuropsychiatric genetics.** *Annals of Medicine* 2005, **37**:121-129.
63. Arias B, Gutierrez B, Pintor L, Gasto C, Fananas L: **Variability in the 5-MT2A receptor gene is associated with seasonal pattern in major depression.** *Molecular Psychiatry* 2001, **239**-242.
64. Enoch MA, Goldman D, Barnett R, Sher L, et al: **Association between seasonal affective disorder and the 5-HT2A promoter polymorphism, -1438G/A.** *Mol Psychiatry* 1999, **4**:89-92.
65. Fukuda Y, Koga M, Arai M, et al: **Monoallelic and unequal allelic expression of the HTR2A gene in human brain and peripheral lymphocytes.** *Biological Psychiatry* 2006, **60**:1331-1335.
66. Poleskaya OO, Aston C, Sokolov BP: **Allele C-specific methylation of the 5-HT2A receptor gene: Evidence for correlation with its expression and expression of DNA methylase DNMT1.** *Journal of Neuroscience Research* 2006, **83**:362-373.
67. Parsons MJ, D'Souza UM, Arranz MJ, Kerwin RW, Makoff AJ: **The -1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity.** *Biol Psychiatry* 2004, **56**:406-410.
68. Bray NJ, Buckland PR, Hall H, Owen MJ, O'Donovan MC: **The serotonin-2A receptor gene locus does not contain common polymorphism affecting mRNA levels in adult brain.** *Molecular Psychiatry* 2004, **9**:109-114.
69. Lopez-Figueroa AL, Norton CS, Lopez-Figueroa MO, et al: **Serotonin 5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT2A receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia.** *Biological Psychiatry* 2004, **55**:225-233.
70. Spurlock G, Heils A, Holmans P, et al: **A family based association study of T102C polymorphism in 5HT2A and schizophrenia plus identification of new polymorphisms in the promoter.** *Molecular Psychiatry* 1998, **3**:42-49.
71. Christiansen L, Tan QH, Iachina M, et al: **Candidate gene polymorphisms in the serotonergic pathway: Influence on depression symptomatology in an elderly population.** *Biological Psychiatry* 2007, **61**:223-230.
72. Jansson M, Gatz M, Berg S, et al: **Association between depressed mood in the elderly and a 5-HTR2A gene variant.** *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics* 2003, **120B**:79-84.
73. Illi A, Setala-Soikkeli E, Viikki M, et al: **5-Htr1A, 5-Htr2A, 5-Htr6, Tph1 and Tph2 Polymorphisms and Major Depression.** *Neuroreport* 2009, **20**:1125-1128.
74. Ohara K, Nagai M, Tani K, Tsukamoto T, et al: **Polymorphism in the promoter region of the alpha(2A) adrenergic receptor gene and mood disorders.** *Neuroreport* 1998, **9**:1291-1294.

75. Shaikh SA, Strauss J, King N, et al: **Association study of serotonin system genes in childhood-onset mood disorder.** *Psychiatric Genetics* 2008, **18**:47-52.
76. Oswald P, Souery D, Massat I, et al: **Lack of association between the 5HT(2A) receptor polymorphism (T102C) and unipolar affective disorder in a multicentric European study.** *European Neuropsychopharmacology* 2003, **13**:365-368.
77. Minov C, Baghai TC, Schule C, et al: **Serotonin-2A-receptor and -transporter polymorphisms: lack of association in patients with major depression.** *Neuroscience Letters* 2001, **303**:119-122.
78. Zhang HY, Ishigaki T, Tani K, et al: **Serotonin 2A receptor gene polymorphism in mood disorders.** *Biological Psychiatry* 1997, **42**:1188.
79. Yoon HK, Kim YK: **Association between serotonin-related gene polymorphisms and suicidal behavior in depressive patients.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2008, **32**:1293-1297.
80. De Luca V, Likhodi O, Kennedy JL, Wong AHC: **Differential expression and parent-of-origin effect of the 5-HT2A receptor gene C102T polymorphism: Analysis of suicidality in schizophrenia and bipolar disorder.** *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics* 2007, **144B**:370-374.
81. Videtic A, Pungercic G, Pajnic IZ, et al: **Association study of seven polymorphisms in four serotonin receptor genes on suicide victims.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006, **141B**:669-672.
82. Crawford J, Sutherland GR, Goldney RD: **No evidence for association of 5-HT2A receptor polymorphism with suicide.** *American Journal of Medical Genetics* 2000, **96**:879-880.
83. Bondy B, Kuznik J, Baghai T, et al: **Lack of association of serotonin-2A receptor gene polymorphism (T102C) with suicidal ideation and suicide.** *American Journal of Medical Genetics* 2000, **96**:831-835.
84. Preuss UW, Soyka M, Koller G, Bahlmann M, Bondy B: **Association between suicidal behavior and 5-HT2A-T102C polymorphism in alcohol dependents compared to controls** *American Journal of Medical Genetics* 2000, **96**:517-518.
85. Myers RL, Airey DC, Manier DH, Shelton RC, Sanders-Bush E: **Polymorphisms in the regulatory region of the human serotonin 5-HT2A receptor gene (HTR2A) influence gene expression.** *Biol Psychiatry* 2007, **61**:167-173.
86. Stockmeier CA: **Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter.** *J Psychiatr Res* 2003, **37**:357-373.
87. Roy A: **Genetic influence on suicide risk.** *Clinical Neuroscience Research* 2001, **324**-330.
88. Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G: **A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders.** *Mol Psychiatry* 2003, **8**:574-591.
89. Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G: **A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior.** *Molecular Psychiatry* 2003, **8**:646-653.
90. Hoefgen B, Schulze TG, Ohlraun S, et al: **The power of sample size and homogenous sampling: association between the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism and major depressive disorder.** *Biol Psychiatry* 2005, **57**:247-251.
91. Munafo MR, Clark TG, Roberts KH, Johnstone EC: **Neuroticism mediates the association of the serotonin transporter gene with lifetime major depression.** *Neuropsychobiology* 2006, **53**:1-8.

92. Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP: **Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics.** *Mol Interv* 2004, **4**:109-123.
93. Kiyohara C, Yoshimasu K: **Association between major depressive disorder and a functional polymorphism of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) transporter gene: a meta-analysis** *Psychiatric Genetics*, **20**: 49-58, 2010.
94. The International HapMap Project: *Nature* 2003, **426**:789-796.
95. Statham DJ, Heath AC, Madden PAF, et al: **Suicidal behaviour: an epidemiological and genetic study.** *Psychological Medicine* 1998, **28**:839-855.
96. Hrdina PD, Bakish D, Chudzik J, Ravindran A, Lapierre YD: **Serotonergic Markers in Platelets of Patients with Major Depression - Up-Regulation of 5-Ht2 Receptors.** *Journal of Psychiatry & Neuroscience* 1995, **20**:11-19.
97. Hamilton M: **Rating depressive patients.** *Journal of Clinical Psychiatry*, **41**: 21-24, 1980.
98. Robins LN, Wing J, Wittchen HU, Helzer JE, et al: **The Composite International Diagnostic Interview. An epidemiologic instrument suitable for use in conjunction with different diagnostic systems and in different cultures** *Arch. Gen. Psychiatry* 1998, **45**:1069-1077.
99. King M, Weich S, Torres-Gonzalez F, et al: **Prediction of depression in european general practice attenders: the PREDICT study.** *BMC Public Health* 2006, **6**:6.
100. Goldberg D: **GHQ and Psychiatric Case.** *British Journal of Psychiatry* 1979, **134**:446-447.
101. Conde L, Vaquerizas JM, Dopazo H, et al: **PupaSuite: finding functional single nucleotide polymorphisms for large-scale genotyping purposes.** *Nucleic Acids Research* 2006, **34**:W621-W625.
102. Riva A, Kohane IS: **A SNP-centric database for the investigation of the human genome.** *Bmc Bioinformatics* 2004, **26**:5.
103. Sham PC, Curtis D. Monte-Carlo: **Tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci.** *Annals of Human Genetics* 1995, **59**:97-105.

CAPITULO 4

***La investigación neuropsicológica en el trastorno delirante: una
revisión exhaustiva***

***I. Ibañez-Casas
J.A. Cervilla Ballesteros***

La investigación neuropsicológica en el trastorno delirante: una revisión exhaustiva

Inmaculada Ibañez-Casas^{1,2,3,4} y Jorge A. Cervilla Ballesteros^{1,2,3,4*}

1, Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación en Red de Salud Mental, CIBERSAM, Centro de Investigación Biomédica, Avda. del Conocimiento S/N, 18100 Armilla (Granada).

2, Instituto de Neurociencias Federico Olóriz, Facultad de Medicina, Avda. de Madrid, 11, 18012 Granada.

3, Grupo de investigación PSYBAM (CTS-628), Facultad de Medicina, Avda. de Madrid, 11, 18012 Granada.

4, Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría, Sección departamental de Psiquiatría, Universidad de Granada, Facultad de Medicina, Avda. de Madrid, 11, 18012 Granada.

*Los autores han contribuido por igual a este trabajo.

Direcciones de correo electrónico:

IIC: iibanez@ugr.es

JACB: jacb@ugr.es

Resumen

En las últimas décadas el estudio del trastorno delirante así como los diferentes aspectos de los delirios han recibido un creciente interés. Sin embargo, este trastorno sigue siendo uno de los menos investigados en psiquiatría. El presente trabajo pretende revisar la literatura referente al trastorno delirante y las aproximaciones teóricas más importantes propuestas para explicar el desarrollo y el mantenimiento de los delirios. Se mostrará cómo la investigación en el trastorno delirante es muy poco frecuente y los delirios dentro de este cuadro psicopatológico han sido escasamente investigados. Nuestro objetivo es establecer el estado de la cuestión y demostrar la escasez de estudios neuropsicológicos en pacientes con trastorno delirante. También justificaremos de forma teórica la necesidad de investigar los correlatos neuropsicológicos de los delirios específicamente en pacientes con este trastorno, dado que la mayoría de la investigación previa se ha centrado en otras condiciones psicóticas.

Introducción

A pesar del creciente interés que ha recibido la investigación de los diferentes aspectos del trastorno delirante en los últimos años, éste sigue siendo hoy en día uno de los trastornos psiquiátricos menos estudiados. La mayoría de los autores están de acuerdo en que esto es debido a algunas dificultades y problemas metodológicos que existen a la hora de investigar dentro de esta área. Éstas dificultades incluirían que la prevalencia del trastorno es supuestamente muy baja, y, además, los pocos pacientes que sufren de ella tienen unos altos niveles de funcionalidad y una gran falta de conciencia sobre el trastorno, lo que les hace reacios a buscar tratamiento y, por lo tanto, menos accesibles para la investigación. Al mismo tiempo, históricamente ha existido cierta confusión respecto a la definición, la terminología y los criterios diagnósticos de este trastorno.

Ya en 1999 Munro [1] escribió: “lamentablemente, hasta hoy se ha llevado a cabo muy poca investigación sistemática en los delirios dentro del trastorno delirante” (p.26). Por desgracia, muy poco ha cambiado en los últimos diez[2] años. Hasta hoy, en el trastorno delirante la norma sigue siendo una investigación descriptiva y no sistemática. La investigación experimental en este trastorno es escasa y muy reciente, lo que hace muy difícil identificar hipótesis etiológicas específicas[2].

El trastorno delirante se denomina así porque los delirios son el elemento más prominente, aunque no el único, en su sintomatología [1]. Una de las primeras barreras para el progreso científico en el área de los delirios ha sido tradicionalmente el problema de su definición[3]. Dado que una discusión detallada a este respecto iría más allá de los objetivos del presente trabajo, mencionaremos únicamente que se han propuesto a lo largo de la historia muchas definiciones de delirios, algunas de ellas contradictorias. Además, en algunos momentos se ha llegado a entender que el trastorno delirante (o la paranoia) no tenía entidad propia como trastorno y ha sido catalogado como uno más dentro del grupo de las esquizofrenias. Más aún, términos tales como paranoia, delirios de persecución o delirios de referencia se han utilizado al mismo tiempo como sinónimos y para referirse a conceptos diferentes[4]. Debido a esta gran confusión en torno a los términos y sus definiciones, la literatura generalmente ha sido incapaz de separar el trastorno delirante de otros trastornos como la esquizofrenia, la parafrenia, la psicosis cíclica, las psicosis reactivas breves (episodio psicótico breve) y los síndromes de falsas identificaciones delirantes [1].

Por su parte, muy pocas investigaciones se han centrado en clarificar los mecanismos neuropsicológicos que están a la base de los delirios, especialmente en pacientes con trastorno delirante. Las inferencias sobre los aspectos neuropsicológicos de los delirios se han realizado principalmente a partir de las comparaciones entre pacientes con esquizofrenia paranoide y pacientes con otros tipos de esquizofrenia no paranoide [5-9]. (Para más información, se puede consultar la revisión de Zalewski y colaboradores [10]). Pero uno podría cuestionarse hasta qué punto estas conclusiones, basadas en estudios en esquizofrenia, son o no acertadas para los pacientes con trastorno delirante dado que, por definición, los delirios se suponen diferentes en el trastorno delirante y en la esquizofrenia (p.e. en el primero no son bizarros, mientras que en el segundo sí lo son). Además, para que estas inferencias fueran posibles, los estudios en pacientes con cuadros psicopatológicos diferentes al trastorno delirante deberían tener en cuenta los efectos de algunos factores diferenciadores tales como la presencia de alucinaciones, contenidos delirantes diferentes y nivel de funcionalidad del paciente, lo que, hasta donde sabemos, no se ha hecho aún. En nuestra opinión, los pacientes con trastorno delirante proporcionan una oportunidad ideal de

estudiar los delirios sin esos factores confusores que se encuentran en pacientes con esquizofrenia y que incluyen tanto síntomas positivos como negativos (alucinaciones, comportamiento desorganizado, alogia, aplanamiento afectivo o abulia), como alteraciones en el comportamiento y en las creencias y un funcionamiento social y ocupacional dañado.

Aunque se han publicado previamente algunas revisiones centradas en los delirios [4,11-15] la presente revisión intenta proporcionar una visión actualizada del tema y, al mismo tiempo, incorporar una perspectiva totalmente distinta, apuntando hacia la importancia de la investigación neuropsicológica en la comprensión del fenómeno delirante. Además, reconocemos que las revisiones previas se han centrado principalmente en los delirios persecutorios, dado que son, con mucho, los delirios más frecuentes en la clínica. Pero nosotros defendemos que en el trastorno delirante también están incluidos delirios con contenidos distintos y que éstos deberían también recibir una atención empírica apropiada. Siendo los delirios, como son, el síntoma principal del trastorno delirante, y dado que existe una gran falta de investigación en pacientes con este trastorno, la mayor parte de la literatura que puede revisarse y que se presenta en este trabajo es la investigación de los delirios en diferentes categorías diagnósticas, principalmente en pacientes con esquizofrenia paranoide.

Breve historia del trastorno delirante

Hacia finales del siglo XIX, la paranoia era un diagnóstico psiquiátrico bien establecido y se consideraba como una patología bastante común. Kraepelin [16] fue el primer autor moderno que describió este trastorno de un modo sistemático. Él proponía que la paranoia era un trastorno independiente que se presentaba con delirios bien sistematizados pero no bizarros, con un curso crónico pero no degenerativo y con una implicación leve del afecto y la voluntad. Más tarde, Bleuler [17] sugirió que la paranoia era en realidad una forma rara de la esquizofrenia, así que para mediados del siglo, en su sentido técnico, el término paranoia prácticamente cayó en desuso. Durante las décadas posteriores, aunque la categoría diagnóstica había sido eliminada, los casos obviamente no desaparecieron. Sin embargo, los pacientes que presentaban estos síntomas eran diagnosticados con esquizofrenia, lo que creó una gran confusión terminológica y ha supuesto una de las muchas dificultades para la investigación en este campo hasta la fecha. En los años 70 y 80 del pasado siglo un gran número de autores insistieron en que, a pesar de la gran confusión desde la muerte de Kraepelin, la paranoia existía, era más frecuente de lo que se había creído y era posible diagnosticarla a través de criterios [18-20]. La tercera edición revisada del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-III-R, [21]) apoyó esta visión y su descripción de “trastorno delirante (paranoico)” era muy parecida a la de Kraepelin, excepto que ahora se permitía que aparecieran alucinaciones no prominentes. Así, rebautizada como trastorno delirante, la paranoia fue firmemente restablecida como categoría diagnóstica en 1987 por el DSM-III-R y ha sido aceptada bajo esta denominación en el DSM-IV [22] y el DSM-IV-TR [23].

El concepto actual de trastorno delirante

El trastorno delirante está caracterizado por la presencia de creencias falsas que se mantienen con una firme convicción a pesar de que exista evidencia en contra y que vienen típicamente acompañadas de una fuerte respuesta emocional y una vigilancia exagerada [14]. Estas creencias delirantes son normalmente monotemáticas, están encapsuladas, y no son de contenido bizarro, a diferencia de los delirios presentes en la esquizofrenia [24].

De acuerdo con los criterios del DSM-IV-TR [23], los delirios deben estar presentes al menos durante un mes y no debe cumplirse el criterio A para la esquizofrenia. Además, se pueden presentar alucinaciones no prominentes, particularmente de naturaleza táctil u olfatoria, que están típicamente relacionadas con el contenido delirante. Por definición, en los pacientes con trastorno delirante no se observa un marcado deterioro funcional y el comportamiento no es extraño o bizarro. Pueden presentarse episodios afectivos, pero éstos son breves en relación con la duración de las creencias delirantes. Por último, para el diagnóstico de trastorno delirante, el uso o abuso de sustancias o cualquier condición médica no pueden ser los causantes de estos delirios. Se han especificado siete tipos distintos de trastorno delirante de acuerdo con la temática central del delirio: erotomaniaco, de grandiosidad, celotípico persecutorio, somático, mixto y no especificado.

Dado que los delirios representan el síntoma principal del trastorno delirante, es importante definir este término. El DSM-IV-TR considera que un delirio es:

“Una creencia falsa basada en una inferencia incorrecta realizada a partir de una realidad exterior que se mantiene de forma firme a pesar de lo que casi todo el mundo cree y a pesar de lo que constituye una prueba incontrovertible y obvia de evidencia en contra. La creencia no es aceptada normalmente por otros miembros de la cultura o subcultura de la persona” (p. 299).

No obstante, cada una de las condiciones incluidas en esta definición o es incoherente, o está sujeta a ejemplos en contra bastante significativos [25]. La investigación ha demostrado definitivamente que los delirios no son entidades discretas y discontinuas [4] y que son fenómenos complejos y multidimensionales que no son siempre tan fijos ni tan indiferentes a la evidencia o la razón [26].

Desde el punto de vista de Oltmanns [27], para determinar la presencia o no de un delirio es mejor considerar una lista de características o dimensiones (ninguna de las cuales es necesaria ni suficiente) de tal manera que, si se presentan a la vez, pueden proporcionar un mayor acuerdo sobre la presencia de un delirio. De este modo, cuando una creencia es implausible, infundada, mantenida firmemente, no compartida por otros, molesta y preocupante, es muy probable que se trate de un delirio [4]. Esta es solo una de las formas prácticas de definir los delirios que se han propuesto para superar los problemas con las definiciones actuales mencionadas anteriormente, pero esta definición no está tan aceptada dentro de la comunidad científica como las definiciones del DSM-IV-TR o de la CIE-10.

Los delirios se presentan en una gran cantidad de trastornos psiquiátricos y neurológicos. Se consideran síntomas de primer nivel en algunos trastornos psicóticos diferentes del trastorno delirante, tales como la esquizofrenia (donde el 50% de los pacientes padecen delirios), trastorno esquizofreniforme o trastorno esquizoafectivo [15]. Los delirios también pueden presentarse en otros trastornos mentales no psicóticos. Por ejemplo, el 15% de pacientes con depresión unipolar, el 28% de pacientes con trastorno bipolar y el 30% de pacientes con trastornos de estrés postraumático presentan delirios. Estos síntomas también ocurren en asociación con algunas condiciones neurofisiológicas tales como la demencia, la epilepsia del lóbulo temporal, la corea de Huntington, el Parkinson, la esclerosis múltiple y el daño cerebral traumático. Además de todo esto, también se ha encontrado que alrededor del 15% de la población general experimenta delirios de manera regular [4]. Sin embargo, en las últimas décadas ha habido una tendencia a considerar los delirios como un fenómeno de interés por sí mismo, más que un síntoma de una enfermedad mental severa [28], y esto ha permitido un crecimiento importante en el estudio de los delirios.

En último lugar, es interesante mencionar que existe cierta evidencia consistente con la idea de que las experiencias delirantes clínicas y no clínicas están vinculadas. Por ejemplo, tanto las experiencias clínicas como las no clínicas se han asociado con los mismos factores de riesgo clínicos y demográficos, lo que se ha interpretado como evidencia de la existencia de una “continuidad etiológica” [29]. De este modo, estudiar las experiencias delirantes no clínicas podría también ayudar a entender las más severas y clínicamente relevantes [4].

Epidemiología del trastorno delirante

El trabajo más influyente sobre las características epidemiológicas del trastorno delirante hasta la fecha ha sido el metaanálisis de Kendler [30] en el cual se analizaron 17 estudios publicados. Posteriormente, De Portugal, González, Haro, Autonell y Cervilla [31] proporcionaron una actualización, encontrando algunos resultados diferentes. Kendler estimó que la prevalencia del trastorno delirante se encontraba entre 24-30 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que De Portugal et al. encontraron casi el doble de prevalencia en su muestra comunitaria (0,006%). El tipo más prevalente de trastorno delirante es el persecutorio, tal y como han demostrado consistentemente varios estudios [31-35]. Por lo que se refiere a la edad de inicio, la mayoría de estudios están de acuerdo en que el trastorno delirante es predominantemente un trastorno que se inicia en la edad adulta, y las medias de edad de inicio oscilan entre los 35 y los 55 años [30-32,36]. Con respecto a la distribución entre los sexos, se ha encontrado frecuentemente que el trastorno delirante es más prevalente en las mujeres, con ratios mujer/hombre que oscilan entre 1.29 y 3 [31,33-35]. Hasta ahora, sólo un estudio ha encontrado resultados opuestos a estos, informando de un ratio mujer/hombre de 0.86 [37]. La mayoría de estudios han encontrado que alrededor de la mitad de los pacientes no están casados, lo que sugiere una dificultad entre éstos para iniciar o mantener relaciones personales estables [30,31,33].

Algunos de los factores de riesgo que han sido implicados en el desarrollo del trastorno delirante incluyen: bajo nivel socioeconómico, mayor edad, historia familiar de trastornos psiquiátricos (específicamente esquizofrenia, trastorno de personalidad paranoide y/o tendencia premórbida a la celotipia, el recelo o el secretismo), inmigración, déficit sensorial (en particular, sordera) y exposición a acontecimientos vitales estresantes [31,32].

Por último, se ha encontrado que los índices de comorbilidad psiquiátrica entre pacientes diagnosticados con trastorno delirante es bastante alta, oscilando entre un 64.8% encontrado en el estudio de Grover, Biswas y Avasthi [36] y un 46.5% en el de De Portugal et al. [32], siendo los trastornos del estado de ánimo los más frecuentes.

Teorías sobre los delirios

De acuerdo con Bell et al. [25], los modelos teóricos que han surgido en las últimas décadas para explicar los delirios pueden ser agrupados en tres líneas principales. Primero, los modelos de *creencia positiva* están basados en el estudio de la psicopatología como una forma de inferir cómo tienen lugar los procesos normales. Estos modelos tienen su origen en la neuropsiquiatría cognitiva y se han centrado en estudiar los delirios monotemáticos relacionados con daños cerebrales¹. Uno de los modelos más populares dentro de este grupo es el llamado “*Teoría de los dos factores*” de Langdon y Coltheart [38]. El segundo grupo de modelos ha sido denominado modelos de *creencia negativa*, debido a que estos modelos

¹ Refiriéndose a falsas identificación de la imagen en el espejo, somatoparafrenia, delirios de Capgras, Fregoli y Cotard y delirios de control.

intentan explicar únicamente los procesos patológicos implicados en los delirios, sin vínculo alguno con los procesos normales. Estos modelos se han centrado tradicionalmente en las psicosis funcionales o idiopáticas². Los modelos de Freeman y Garety [39] y de Bentall y colaboradores [11,40] son sólo dos ejemplos de las múltiples teorías incluidas en este grupo. Por último, existe un conjunto de modelos que se incluirían en el grupo de las *aproximaciones de continuo* que, inspiradas por metodologías epidemiológicas, buscan predictores y correlatos de los delirios. Dado que estos últimos modelos no se refieren a los procesos de formación de los delirios, son compatibles tanto con los modelos de creencia positiva como con los de creencia negativa. De acuerdo a estos modelos, los delirios no son cualitativamente diferentes de las creencias normales, sino que representan un extremo en la distribución de fenómenos mentales anómalos en la población [41,42]

Dada la complejidad y heterogeneidad que se puede encontrar en las aproximaciones teóricas a los delirios merece la pena ofrecer una revisión amplia de todos estos modelos.

Modelos neurofisiológicos

En las décadas de los 70 y 80 del pasado siglo se propusieron muchos modelos para explicar los trastornos delirantes de origen "orgánico". Se sugirió entonces que los factores neurofisiológicos podrían estar en la base de los trastornos delirantes dado que los delirios ocurren en muchos trastornos y condiciones que producen daños a nivel cerebral (p.e. daños cerebrales traumáticos o abuso de drogas). Estas correlaciones entre problemas cerebrales y síntomas delirantes podrían sugerir que una función cerebral dañada puede jugar un papel importante en la patogénesis de los trastornos delirantes. En línea con esta asunción, se demostró que el trastorno delirante puede ser consecuencia de daños o disfunciones en varias regiones cerebrales. Por ejemplo, las lesiones en el sistema límbico y las estructuras subcorticales se han asociado tradicionalmente con los delirios [41,43,44] predominantemente en el hemisferio izquierdo[45]. Sin embargo, no todos los pacientes con daños en esas regiones acaban desarrollando delirios, así que deben existir algunos otros factores predisponentes [14]. Alternativamente, también se ha venido discutiendo que existen asociaciones entre daños en el hemisferio derecho y creencias delirantes [46,47]. Concretamente, se ha sugerido que el daño en el hemisferio derecho puede producir una disfunción en un sistema de evaluación de creencias localizado en ese hemisferio [38,47], como se discutirá más adelante. A día de hoy puede sugerirse que la región asociada con el proceso cognitivo de evaluación de creencias está localizada en el lóbulo frontal derecho, y en línea con esto, se podría predecir que los pacientes con este tipo de delirios deberían tener un daño frontal derecho [48]. Sin embargo, aunque esta explicación hemisférica es consistente con algunos de los hallazgos en delirios que ocurren tras determinados daños cerebrales o incluso, en los casos de demencia [49-51] la evidencia a favor de una relación funcional tan clara en los delirios idiopáticos todavía no se ha encontrado [52]. Además, es importante resaltar que ninguno de estos resultados se ha puesto a prueba en pacientes con trastorno delirante.

Es interesante advertir que algunos autores incluso han propuesto que debe existir una relación inversa entre daño neuropsicológico y complejidad de los delirios, lo que significaría que una función cognitiva intacta sería una condición necesaria para que se desarrollaran creencias delirantes elaboradas [14]. En otras palabras, se cree que el daño neuropsicológico en el trastorno delirante debe ser mínimo porque, si no, los delirios complejos no podrían

² Refiriéndose a las psicosis desarrolladas en ausencia de ningún daño cerebral conocido.

desarrollarse. Así podría ocurrir que la evaluación neuropsicológica podría ser la única que arrojará pistas sobre estas disfunciones sutiles que estarían ocurriendo en los pacientes delirantes. De acuerdo con esto, se podría esperar que los delirios correlacionaran con pequeños daños en procesamiento cognitivo (p.e., atención, aprendizaje y memoria, percepción, planificación, pensamiento lógico) pero la investigación parece no apoyar esta hipótesis por el momento. Por desgracia, ninguno de los estudios mencionados ha sido llevado a cabo en pacientes con trastorno delirante. Todos ellos estudiaron pacientes con delirios, pero todos estaban diagnosticados con esquizofrenia. Hasta la fecha, los datos neuropsicológicos en pacientes delirantes no esquizofrénicos son escasos y los correlatos neuropsicológicos de los delirios siguen sin ser identificados, especialmente teniendo en cuenta los problemas metodológicos que venimos mencionando [14].

Aparte de estas hipótesis localizacionistas, algunos autores han sugerido que el responsable de producir los síntomas paranoides podría ser un estado hiperdopaminérgico en el cerebro [53]. Específicamente, se ha propuesto que estos pacientes podrían tener un sistema dopaminérgico hiperreactivo [54]. Más recientemente, algunos autores han concluido que esta disfunción dopaminérgica podría tener una base genética. En particular, los polimorfismos en los genes DRD2, DRD3 y TH parecen jugar un papel en la base genética de este estado hiperdopaminérgico que produciría los síntomas paranoides [55]. En cualquier caso, sería necesario poner a prueba esta teoría dopaminérgica específicamente en pacientes con trastorno delirante, lo cual no se ha hecho hasta la fecha.

Experiencias perceptivas anómalas

Maher [56-59] mantenía que los delirios no se producían a través de un proceso de razonamiento erróneo, sino que constituían respuestas racionales a experiencias perceptuales inusuales. Según este autor, “los delirios deberían verse como la reacción de un individuo normal y sano a experiencias perceptuales anormales pero reales” [59]. Maher propuso que estas experiencias internas inusuales eran de naturaleza fundamentalmente biológica. Posteriormente, estos delirios se mantienen de la misma forma que cualquier otra creencia firme. Son reforzadas gracias a la reducción de ansiedad que produce el encontrar una explicación a esas experiencias extrañas.

En 1997 Ellis y colaboradores encontraron apoyo empírico a este modelo cuando estudiaban las respuestas de conductancia de la piel en pacientes con delirios de Capgras ante los rostros de familiares cercanos [60]. Estos autores encontraron que los pacientes mostraban la misma respuesta autonómica tanto a los rostros familiares como a los desconocidos, lo que fue interpretado como una anomalía en su percepción que podría estar provocando la formación del delirio. De forma similar, también se han encontrado, por ejemplo, defectos en los procesos de auto-monitorización en personas con delirios de control [61-63]. Sin embargo, la mayoría de estudios no han encontrado diferencias perceptuales significativas entre pacientes con delirios y controles sanos [64]. Además, no todas las personas que experimentan percepciones anómalas acaban desarrollando creencias delirantes y, por su lado, una minoría significativa de pacientes con delirios no informan sobre este tipo de experiencias [65]. Más recientemente, el grupo de Bell [66] ha mostrado que los pacientes con delirios no puntuaban significativamente diferente de los controles sanos en percepción anómala medida con la Escala de Percepciones anómalas de Cardiff (CAPS) [65], lo que constituye la primera evidencia en contra de este tipo de experiencias en la causación de los fenómenos delirantes. Hasta donde sabemos, estos resultados no han sido replicados aún.

En resumen, el modelo de experiencias anómalas es un área de estudio difícil y muy poco estudiada, la literatura está fragmentada y le faltan hallazgos consistentes. Aún siendo un modelo de formación del delirio elegante, este modelo no puede proporcionar una respuesta completa a la formación y mantenimiento de los delirios [4].

Teoría de los dos factores

Coltheart y colaboradores propusieron que las anomalías perceptuales no eran suficientes para el desarrollo de los delirios y alegaron que debía existir otro factor adicional implicado [38]. Este modo de pensar estaba basado principalmente en el hecho de que algunos individuos con experiencias perceptuales anómalas no desarrollaban creencias delirantes. Por ejemplo, se había encontrado que los pacientes con lesiones frontales que experimentaban una falta de respuesta autonómica a los rostros familiares (igual que ocurría con los pacientes con delirios de Capgras) no mostraban ideación delirante [67]. Esto también se encontró en cuanto a experiencias de aplanamiento afectivo sin desarrollar delirios de Cotard, pérdida de las experiencias de auto-iniciación de la acción sin desarrollar delirios de control, experiencias de miembro fantasma sin negación delirante de pertenencia de ese miembro y, finalmente, experiencias de no reconocer el propio rostro en el espejo o interacción errónea con los espejos sin desarrollar delirios de falsas identificaciones en el espejo [68].

A partir de toda esta evidencia, Langdon, Coltheart y sus colaboradores propusieron que la perspectiva de Maher estaba incompleta y desarrollaron una teoría de dos factores para explicar la formación de los delirios monotemáticos de acuerdo con la cual deberían ocurrir dos anomalías para que se desarrollasen dichos delirios [38]. El primer factor consiste en una percepción aberrante causada por un fallo sensorial o una disfunción en los mecanismos atencionales (una anomalía neuropsicológica). De acuerdo con el modelo de Coltheart y sus colegas, diferentes tipos de experiencias inusuales están en la base de diferentes tipos de delirios. Este primer factor es lo que inicialmente provoca la creencia delirante, y junto con algunos sesgos cognitivos tales como los atribucionales o los de recogida de datos, es el responsable del contenido del delirio. El segundo factor explicaría la presencia del delirio y se supone que es común para todos los pacientes y delirios. De acuerdo con el modelo, este segundo factor no depende de sesgos atribucionales ni de recogida de datos. Los autores defienden que los pacientes con delirios tienen un fallo en la capacidad de descartar una creencia que es implausible e inconsistente con su conocimiento previo, y este fallo evita que la persona rechace la creencia delirante incluso ante una fuerte evidencia en contra de ella. Este segundo factor se supone que emerge como una consecuencia de un déficit en el razonamiento asociado al córtex frontal derecho [69]. Los primeros datos que apoyaban la existencia de este daño en el hemisferio derecho aparecieron en la revisión de Burguess, Baxter, Rose y Alderman [70] de veintidós casos de delirios, de los cuales, dieciocho tenían una disfunción en el lóbulo frontal derecho y dos tenían un daño bilateral difuso. Algunos trabajos posteriores han ofrecido un apoyo consistente a favor de una disfunción de esta región en diferentes formas de delirios. Por ejemplo, Papageorgiou, Ventouras, Lykouras, Uzunoglu, y Christodolou [71] estudiaron el componente P300 dado que suponían que era el “correlato fisiológico del proceso de actualizar hipótesis cognitivas, o de la memoria operativa cuando actualiza lo que se espera del ambiente” (p.366), y encontraron una disminución significativa de la amplitud del componente P300 en la región frontal derecha de pacientes con delirios de Capgras y Frégoli. Más aún, los electrodos situados en esta región fueron los únicos que distinguían pacientes de controles. Posteriormente, Staff y colaboradores [72] compararon pacientes con Alzheimer con delirios frente a los que no los tenían utilizando imágenes cerebrales de tomografía por emisión de fotón simple (SPET) y encontraron que el

grupo con delirios mostraba una hipoperfusión en regiones frontales y límbicas derechas. La implicación del hemisferio frontal derecho en los delirios ha sido también demostrada en estudios de casos únicos [73-77]. Sin embargo, estos hallazgos han sido únicamente encontrados en delirios que han resultado de un daño cerebral o de otra patología, y no han sido confirmados en delirios idiopáticos hasta la fecha.

Los propios autores reconocieron que la inclusión de este segundo factor sacaba a la luz el problema de explicar por qué los delirios son monotemáticos (los pacientes con delirios no los tienen acerca de todo; al contrario, la temática del delirio suele estar bastante circunscrita) y la apreciación de su implausibilidad (los pacientes reconocen que sus creencias delirantes son extravagantes) que se encuentra en algunos pacientes con delirios. Además, algunos delirios parecen ir y volver dependiendo de diferentes circunstancias. Toda estas evidencias hicieron a los autores proponer que el sistema de evaluación de creencias en los pacientes con delirios no funciona bien, pero no está totalmente destruido [48,64,69]. De esta forma, los pacientes a los que se les proporciona evidencia correcta en contra de su creencia delirante (como en la terapia cognitivo-conductual) pueden rechazarla con éxito.

Finalmente Coltheart y sus colegas incorporaron algunos conceptos motivacionales dentro del primer factor de su teoría (ver apartado de Modelos Integrativos).

Atención

Durante mucho tiempo se ha propuesto que los sesgos atencionales pueden jugar un papel en el desarrollo y mantenimiento de las creencias delirantes. A favor de esto, se ha encontrado, por ejemplo, que las personas con delirios tienden a realizar un procesamiento rápido de los estímulos amenazantes [3,11,78]. Otros estudios han sugerido que los pacientes con delirios puede que vean los estímulos como amenazantes incluso en situaciones que no lo son. De acuerdo con Gilleen y colaboradores [3] es esta expectativa mantenida de amenaza en pacientes con delirios persecutorios lo que les lleva a percibir peligro en situaciones ambiguas o inapropiadas. Sin embargo, se ha encontrado que en los pacientes con delirios este tipo de sesgos solo aparecen en las etapas iniciales de la orientación atencional. Sorprendentemente, en etapas posteriores se ha encontrado que la atención controlada tiende a alejarse de la información amenazante [79-82]. Esto se ha interpretado como el resultado del un sesgo de recogida de datos conocido como el de "saltar a las conclusiones", que discutiremos más adelante [83]. Por consiguiente, existe una evidencia consistente a favor de un sesgo inicial automático y preatencional hacia la información amenazante, pero un posterior sesgo de atención controlada para apartarse del peligro. Esto se ha denominado como "*patrón de vigilancia-evitación de información relacionada con la amenaza*" [84].

Además de todo esto, también se ha propuesto que la información auto-referente es particularmente importante para las personas con delirios [85]. Sorprendentemente, este foco en la información auto-referente se ha encontrado también en individuos con tendencia al delirio [86] lo que podría indicar que éste es un factor predisponente a la hora de desarrollar pensamiento delirante. Y dado que los individuos con delirios atienden selectivamente a la información amenazante y a la información auto-referencial, también tienen un mejor recuerdo de este tipo de datos [83], lo que podría explicar el mantenimiento de los delirios y su resistencia al cambio.

Pero los individuos con delirios no solo atienden a la información amenazante y auto-referencial, sino que, sobre todo, atienden selectivamente a aquella información que confirma su creencia delirante [87]. En otras palabras, las personas con delirios tienden a ignorar la información que va en contra de sus creencias, lo que se ha denominado *sesgo*

contra la evidencia desconfirmatoria o sus siglas en inglés BADE (*bias agaisnt disconfirmatory evidence*). Este tipo de sesgo ha sido investigado utilizando una variación neuropsicológica del subtest de historietas del WAIS-III en personas con esquizofrenia y con trastorno esquizoafectivo [88]. Estos pacientes tendían a no descartar sus interpretaciones iniciales cuando se les ofrecía información incompatible, al tiempo que mostraban una integración de la evidencia confirmatoria similar a la de los controles. En individuos sanos, Buchy, Woodward, y Liotti [89] encontraron que este sesgo contra la evidencia desconfirmatoria correlacionaba positivamente con las puntuaciones en el SPQ (Schizotypal Personality Questionnaire). Haciendo un análisis diferente de sus datos [90], estos autores concluyeron que el sesgo contra la evidencia confirmatoria es independiente de otras medidas cognitivas tales como memoria, inteligencia y funciones ejecutivas. Por desgracia, no hay datos disponibles sobre este sesgo en pacientes con trastorno delirante hasta el momento [24].

Adicionalmente, un estudio reciente ha encontrado que los pacientes con trastorno delirante y los pacientes con esquizofrenia muestran déficits similares en atención verbal y sostenida comparados con controles sanos, pero esos déficits eran menos severos que los encontrados en pacientes con esquizofrenia no paranoide [91] lo que apunta a la existencia de un continuo en la severidad de este tipo de déficit.

Desde un punto de vista evolutivo también se ha sugerido que los sesgos encontrados en los pacientes con delirios podrían perfectamente provenir de una variación extrema de los mecanismos adaptativos de percepción de la amenaza que han servido para la supervivencia de la especie humana [84] lo que, de nuevo, apuntaría hacia una visión de continuo de los delirios.

En resumen, los pacientes con delirios muestran sesgos atencionales sólidos que incluyen una percepción de peligro exagerada (incluso en situaciones no amenazantes) y una preferencia por información auto-referente que puede hacerles llegar a conclusiones delirantes; una posterior evitación de estímulos amenazantes, que puede utilizarse para reducir la ansiedad y, de esta manera, mantiene el sistema delirante; un mejor recuerdo de la información amenazante y auto-referente y una evitación de la información que contradice su creencia (BADE), lo que explicaría el mantenimiento de los delirios, y, finalmente, ciertos déficit en atención verbal y sostenida. En cualquier caso, se necesita mayor investigación en esta área dado que, hasta ahora, la investigación acerca de los correlatos atencionales de los delirios se ha llevado a cabo principalmente en pacientes diagnosticados con esquizofrenia, y los datos en pacientes con trastorno delirante son todavía muy limitados.

Procesos afectivos

En los últimos años, los investigadores han comenzado a prestar atención al papel de los procesos afectivos en la experiencia delirante [92,93]. Entre este tipo de factores, la ansiedad y la depresión son los que han recibido un mayor esfuerzo investigador.

Ansiedad

Está ampliamente aceptado que tanto los pensamientos persecutorios como los ansiosos se refieren a una anticipación de la amenaza [94,95]. Además, también se ha argumentado que la ansiedad ayuda a crear pensamientos de contenido paranoide y que ciertos procesos relacionados con ella contribuyen al mantenimiento y el malestar asociado con este tipo de experiencias [4]. En general, es un hecho bastante aceptado que la paranoia severa se construye a partir de componentes emocionales. Es más, tanto la ansiedad como la paranoia es posible que compartan unos marcadores genéticos similares [96]. En apoyo de este papel

de la ansiedad en el desarrollo y el mantenimiento de los delirios se ha encontrado que casi dos tercios de los individuos con delirios persecutorios tienen un estilo cognitivo que tiende a la preocupación [39,97].

En resumen, en este momento, la evidencia de un vínculo entre ansiedad y paranoia es razonablemente fuerte.

Depresión y Autoestima

Bentall y colaboradores propusieron que las personas con delirios persecutorios construyen éstos para mantener la autoestima, evitando discrepancias entre cómo se perciben a sí mismos y cómo les gustaría ser [11,40]. Esta aproximación, que considera los delirios como un tipo de defensa, se basa en dos conceptos principales: el estilo atribucional y la autoestima. Estos autores consideran que los delirios persecutorios son atribuciones causales externas que se evocan para prevenir auto-representaciones negativas. Se revisará la evidencia a favor de la existencia de este sesgo en el estilo atribucional posteriormente (ver sección de Razonamiento). En cuanto a la autoestima, Bentall y sus colaboradores propusieron inicialmente que la función defensiva de los delirios debería resultar en unos niveles altos o normales de autoestima. Sin embargo, los pensamientos paranoides se han encontrado sistemáticamente asociados con bajos niveles de autoestima [98] y altos niveles de depresión [41,99-103] cosa que no sería de esperar si los delirios sirvieran efectivamente como defensa. Posteriormente Bentall y su grupo propusieron que la clave estaba en que, en las personas con pensamiento delirante, existiría una discrepancia entre la autoestima patente (que sería positiva) y la autoestima encubierta (que sería negativa), lo que ha mostrado ser un constructo muy difícil de investigar. Dos estudios recientes han encontrado estas discrepancias entre autoestima patente y encubierta en personas con delirios [15,104] utilizando una versión adaptada del Test de Asociación Implícita (IAT) [105]. Otros estudios también ha apoyado parcialmente esta predicción usando tareas de Stroop emocional [106] y el Test de Interferencia Pragmática [107,108]. Sin embargo, muchos estudios no han podido replicar estos hallazgos y otros han mostrado resultados poco concluyentes [78,109,110]. Con todo, muchos estudios que han tratado de investigar en este concepto han tenido grandes dificultades a la hora de encontrar un método válido y fiable para medir estas discrepancias [26].

En general, la evidencia no apoya la hipótesis de una autoestima normal o alta en personas con delirios persecutorios tal y como predecía la teoría de Bentall y sus colaboradores. Por ejemplo, la mayoría de personas con delirios persecutorios muestra una autoestima normal o baja. Además, la depresión ha mostrado jugar un papel importante en las puntuaciones en autoestima de pacientes con pensamientos delirantes, del mismo modo que lo hace en la población general, lo que apunta hacia un procesamiento emocional normal en estos pacientes [98]. Finalmente, se ha encontrado que las puntuaciones en convicción sobre los pensamientos delirantes no correlacionan con unos niveles de autoestima patente altos, lo que sería de esperar si los primeros cumplieran un papel defensivo. Con respecto a las medidas de discrepancia entre autoestima patente y encubierta, los estudios no han mostrado consistentemente que ésta se presente en los pacientes con delirios persecutorios, como predice la hipótesis central de Bentall y su grupo. Sin embargo, los datos son consistentes con la posibilidad de que existan dos tipos de paranoia.

Llegados a este punto, es interesante discutir estos dos tipos de paranoia propuestos originalmente por Trower & Chadwick [111] y denominados respectivamente paranoia del tipo “*pobre de mí*” y del tipo “*malo de mí*”. En ambos tipos la idea central es que los demás

planean causar algún tipo de daño a la persona. De acuerdo con estos autores, sin embargo, la diferencia entre los dos tipos de paranoia residiría en si la persona cree merecer o no ese daño por parte de los demás. En la paranoia del tipo “pobre de mí”, la persona vería la maldad y el maltrato por parte de los otros como no merecido, mientras que en la paranoia del tipo “malo de mí” el individuo percibiría esta maldad como merecida por ser perverso o indigno. Esta teoría predice que la paranoia del tipo “malo de mí” estaría caracterizada por una baja autoestima, una evaluación negativa de los otros y unos niveles altos de autoevaluación negativa, ansiedad y depresión.

En apoyo a esta aproximación, Freeman y colaboradores [95] encontraron que las personas con esquizofrenia o trastornos relacionados que pensaban que merecían ser dañados (paranoia del tipo “malo de mí”) estaban significativamente más deprimidos y tenían niveles más bajos de autoestima que aquellos que no pensaban que merecían sufrir daños. Posteriormente, Chadwick, Trower, Juusti-Butler, & Maguire [112] replicaron estos resultados cuando encontraron que la paranoia del tipo “malo de mí” correlacionaba con niveles más altos de autoevaluaciones negativas, ansiedad y depresión, y niveles más bajos de autoestima. Más aún, estos autores encontraron que las diferencias entre los grupos en autoevaluaciones negativas y autoestima persistieron después de controlar las puntuaciones por depresión, lo que indica que estos dos factores pueden ser independientes en personas con delirios. Sin embargo, la asunción de que estos dos tipos de paranoia pueden ser patrones estables fue cuestionada cuando Melo, Taylor y Bentall [113] encontraron que la percepción de si se merece o no la persecución varía a lo largo del tiempo, lo que significa que un mismo paciente podría mostrar paranoia del tipo “pobre de mí” o del tipo “malo de mí” en diferentes momentos. Parece ser que esto depende de las experiencias previas diarias tal y como Bentall y Kaney [114] habían demostrado previamente utilizando un diseño de priming. Por desgracia, no se tomaron medidas de autoestima en el estudio de Melo y colaboradores [113] por lo que solo se pueden hacer inferencias acerca de las puntuaciones en la percepción de si merecían el daño o no, asumiendo que la autoestima correlacionaría con ellas del modo que predice la “teoría del ciclo atribuciones-autorepresentaciones” de Bentall et al., [11] (ver sección de Razonamiento).

En resumen, a día de hoy existe considerable evidencia de que el afecto y los procesos relacionados con él tienen un papel muy importante pero no defensivo en el desarrollo del pensamiento paranoide. Los datos actuales apoyan la noción de que es probable que exista una relación circular, siendo la baja autoestima y la depresión solo dos de los múltiples factores de vulnerabilidad para desarrollar paranoia la cual, por su parte, disminuiría la autoestima e incrementaría la depresión todavía más [4]. Sin embargo, debe hacerse notar de nuevo que la mayoría de los estudios mencionados se llevaron a cabo con pacientes psicóticos en general, y se sabe muy poco acerca de este tipo de relaciones específicamente en el trastorno delirante.

Factores motivacionales

La *necesidad de cierre* (en inglés “need for closure” o NFC) ha sido definida como un factor motivacional que contribuye al sesgo de “saltar a las conclusiones” que está presente con frecuencia en los pacientes con delirios [115]. Esta necesidad de cierre fue definida originalmente por Kruglanski y colaboradores para referirse a un deseo de certeza [116,117]. En efecto, se ha encontrado que los individuos con delirios muestran niveles más altos de esta necesidad de cierre que los controles [15,115,118-121] lo que, junto al sesgo de saltar a las conclusiones haría que los pacientes con delirios fueran muy rígidos cognitivamente a la

hora de tomar decisiones. Todos estos estudios apoyan la idea de que los factores motivacionales juegan un papel fundamental en el desarrollo de los delirios. Sin embargo, la flexibilidad cognitiva en sí misma no ha sido apenas estudiada en pacientes con trastorno delirante por el momento [24].

Razonamiento

Algunos investigadores han intentado identificar si existen sesgos o déficit en el razonamiento de los individuos con trastorno delirante. Sin embargo, tal y como Kemp y sus colaboradores apuntaron [122] los pacientes con delirios no los tienen acerca de todo, así que no puede existir un déficit global en las capacidades de razonamiento. Si esto fuera cierto, podría ocurrir que estos déficit cognitivos, siendo tan sutiles, podrían ser solo detectables a través de una evaluación neuropsicológica, lo que justificaría un mayor esfuerzo investigativo en esta área.

Las teorías propuestas acerca de las anormalidades neurocognitivas presentes en los delirios podrían dividirse en tres líneas principales: las teorías de razonamiento probabilístico (saltar a las conclusiones – en inglés, Jumping to Conclusions ó JTC-), la teoría de los sesgos atribucionales y la Teoría de la Mente (en inglés, Theory of Mind ó ToM) (Kunert et al., 2007).

Se ha encontrado de manera consistente que las personas con delirios requieren menos cantidad de información antes de tomar una decisión comparados con controles sanos [26]. Se ha planteado la hipótesis de que este sesgo a la hora de recopilar información conlleva una aceptación muy rápida de las creencias, incluso a pesar de que haya poca evidencia que las apoye, y de esta forma, podría ser un factor a la hora de desarrollar y mantener los delirios. En otras palabras, los sesgos en la recopilación de datos podrían plausiblemente afectar la formación y el mantenimiento de creencias permitiendo la aceptación rápida de explicaciones implausibles [4]. También se ha propuesto que este sesgo de saltar a las conclusiones podría estar particularmente asociado con la dimensión de convicción de los delirios [123] y se cree que no depende de una toma de decisiones impulsiva ni es una consecuencia de un déficit de memoria [26].

Es interesante que este mismo sesgo de saltar a las conclusiones se ha encontrado también en pacientes con esquizofrenia no paranoide [124], pacientes en los que los delirios han remitido [125] y familiares de primer grado de pacientes con psicosis [126]. Además, este sesgo puede ocurrir también en personas sanas, pero los pacientes delirantes parecen tener la desventaja de un procesamiento de información sesgado, lo que les hace aceptar estas explicaciones implausibles más fácilmente [127] y esto podría explicar la presencia del sesgo de saltar a las conclusiones cuando los delirios no son manifiestos.

El razonamiento probabilístico ha sido estudiado principalmente utilizando un paradigma bayesiano. Los estudios que han utilizado este paradigma han mostrado consistentemente un sesgo de saltar a las conclusiones tanto en personas con delirios como en pacientes con esquizofrenia y trastorno delirante. Sin embargo, estos estudios muestran que, como grupo, las personas con delirios responden de acuerdo con las normas bayesianas, en contraste con una forma más conservadora de comportarse de los controles sanos. En general, estos hallazgos deben ser interpretados como evidencia a favor de la existencia de una tendencia o sesgo (no un déficit) hacia la aceptación temprana de hipótesis que pueden contribuir, bajo ciertas condiciones, a inferencias erróneas y, por lo tanto, a la formación de delirios [26].

Otras tareas empleadas para investigar los sesgos de razonamiento en personas con delirios incluyen las de estimación de probabilidad, comprobación de hipótesis, razonamiento

inductivo y recopilación de datos y pensamiento lógico. Tomando en consideración los resultados de todos los estudios en conjunto podemos llegar a la conclusión de que las personas con delirios no tienen un sesgo en el razonamiento probabilístico, sino que más bien tienen un sesgo a la hora de recopilar información.

Estilo atribucional

Los sesgos atribucionales han sido estudiados extensivamente en las personas con delirios, aunque especialmente en el área de los delirios persecutorios [25]. La literatura sobre el estilo atribucional desarrollada por Bentall y su grupo ha estado íntimamente ligada a la teoría de que los delirios sirven como defensa, pero, como ya hemos comentado, un sesgo en el estilo atribucional no tiene por qué necesariamente servir una función defensiva. Dentro de la teoría del delirio como defensa se proponía que un estilo atribucional caracterizado por culpar a otras personas de los sucesos negativos y atribuirse a uno mismo los positivos está implicado en los delirios persecutorios. Bentall y colaboradores describieron este sesgo como una forma extrema del sesgo de autocomplacencia que está presente en toda la población como una forma de mantener la autoestima [40]. Esto apoyaría la visión de continuum de los delirios también en lo que se refiere a estilo atribucional. Sin embargo, la cuestión no es si los individuos con delirios tienen este sesgo de autocomplacencia para los eventos positivos, sino si se hacen atribuciones externas para los negativos, dado que los pensamientos paranoides tienen un contenido negativo.

De acuerdo con las últimas modificaciones del modelo atribucional de la paranoia, las atribuciones causales y las autorepresentaciones interactuarían en un proceso dinámico denominado “ciclo de atribución-autorepresentación” [11]. Según este modelo, las atribuciones y, por consiguiente, las autorepresentaciones, cambian con el tiempo, y diferentes tipos de atribuciones tendrían diferentes efectos sobre la disponibilidad actual de las autorepresentaciones. Específicamente, las atribuciones internas facilitarían la recuperación de las representaciones referidas a uno mismo y, de este modo, incrementarían las discrepancias entre lo que el individuo es en realidad y lo que le gustaría ser. Por otro lado, las atribuciones externas y personales resultarían en una percepción de actitudes negativas de los otros hacia uno mismo, e incrementarían las discrepancias entre uno mismo y los otros (como ocurre en los delirios persecutorios). Finalmente, las atribuciones externas y situacionales no favorecerían la recuperación de autorepresentaciones negativas ni de percepciones de las actitudes de los otros hacia uno mismo.

Aunque algunos estudios han encontrado que las personas con pensamiento delirante, las personas con tendencia al delirio y los familiares de primer grado de pacientes psicóticos muestran un sesgo hacia las atribuciones externas [78,128], otros estudios no han encontrado esas diferencias [103,129,130]. Por otro lado, también se ha encontrado que los pacientes con delirios están particularmente inclinados a culpar a otras personas en lugar de a las situaciones o a la suerte, especialmente cuando se trata de eventos negativos y cuando el material es autoreferente [26]. Más aún, Langdon y colaboradores [131] encontraron sesgos hacia el exterior en pacientes con delirios severos y moderados, pero no los encontraron en pacientes con delirios leves, lo que sugiere que este efecto puede ser específico a la severidad de la sintomatología [25] y, de nuevo, apunta hacia la visión de continuo que venimos exponiendo.

En resumen, no hay una evidencia empírica firme de que los delirios persecutorios estén asociados con un estilo atribucional externalizante excesivo para los eventos negativos en las personas con trastorno delirante [4,24].

Teoría de la Mente (ToM)

Frith [63] propuso que los delirios de referencia y persecutorios nacen de una incapacidad de representar las creencias, los pensamientos y las intenciones de los demás, esto es, de un déficit en la Teoría de la Mente [26]. La teoría de la mente se refiere a la capacidad de entender los estados mentales (las creencias, deseos, sentimientos e intenciones) en uno mismo o en los otros [132]. Esta aproximación sugiere que, dado que las personas con ideación persecutoria tienen ciertos problemas a la hora de entender las intenciones o los pensamientos de los otros, quizá el mecanismo para determinar los estados mentales ajenos es la causa de los pensamientos persecutorios. Sin embargo, aunque los déficit en teoría de la mente pueden estar presentes en personas con delirios persecutorios, no son ciertamente ni específicos ni necesarios para que se produzcan estas experiencias y su presencia en personas con pensamientos paranoides puede estar ligada en realidad a la presencia de síntomas negativos y trastornos del pensamiento [4]. De hecho, se ha encontrado que los déficit en teoría de la mente correlacionan con los síntomas psicóticos negativos, pero no con los positivos [26]. Más aún, los déficit en teoría de la mente parecen ser más un estado que un rasgo [133] ya que los pacientes en remisión sintomática tuvieron un rendimiento tan bueno como los controles en tareas de teoría de la mente [134,135] y estos déficit generalmente no están presentes en familiares no afectados de pacientes psicóticos [136]. Solo dos estudios han investigado la teoría de la mente en pacientes con trastorno delirante [79,137] y, tomando los resultados en conjunto, se puede concluir que la teoría de la mente en los pacientes con trastorno delirante está generalmente intacta. Pero, de nuevo, la mayoría de los hallazgos han sido obtenidos en pacientes con esquizofrenia y deberían ser investigados más a fondo y replicados en pacientes con trastorno delirante.

Modelos integradores de los delirios

Modelo Cognitivo de los delirios persecutorios de anticipación de la amenaza.

El hecho de conceptualizar los delirios como creencias ha posibilitado una enorme apertura teórica hacia el estudio psicológico de estos fenómenos. El modelo de anticipación de la amenaza [12,13,138] se construye explícitamente sobre la idea de que existen múltiples factores responsables del desarrollo y el mantenimiento de la paranoia. Además, el modelo atiende a la naturaleza multidimensional de las experiencias persecutorias. Existen factores específicos que influyen en el contenido del delirio, en la convicción con que se mantiene la idea delirante, en la persistencia y en el malestar asociado a ella. Es más probable que las ideas persecutorias se conviertan en un delirio cuando existen sesgos en el razonamiento tales como una recopilación de datos reducida (saltar a las conclusiones) [26,138], un fallo a la hora de generar o considerar explicaciones alternativas de las experiencias [139] y un fuerte sesgo de razonamiento confirmatorio ([140]). De acuerdo con este modelo, la ansiedad rasgo tiene un papel directo en la formación de los delirios persecutorios y el mantenimiento de los mismos también está relacionado con ciertos tipos de reacciones emocionales. Dado que los delirios son creencias de amenaza, se mantendrán por medio de los mismos procesos que mantienen la ansiedad tales como la autofocalización y los comportamientos de seguridad [141]. Dicho de forma breve, este modelo establece que los factores psicológicos implicados en la formación y el mantenimiento de los delirios persecutorios incluyen experiencias anómalas producidas por disfunciones cognitivas o drogas [63,142], procesos afectivos tales como ansiedad, preocupación y sensibilidad interpersonal, sesgos de

razonamiento, como confirmación de creencias, saltar a las conclusiones e inflexibilidad en las creencias, y factores sociales como el aislamiento o ciertos traumas.

Integración de teorías motivacionales y de déficit del delirio.

McKay y colaboradores [15] propusieron que la visión más completa acerca de la formación de los delirios implicaría que las aproximaciones motivacionales y de déficit se unificaran de una forma teórica. Los factores motivacionales estarían relacionados con las discrepancias entre la autoestima patente y la encubierta (cumpliendo una función defensiva) y la necesidad de cierre (NFC). Estos motivos afectarían al primer factor dentro de la teoría de los dos factores de Coltheart y colaboradores, produciendo una percepción anómala del entorno.

Estructura cognitiva y afectiva de los delirios paranoides.

Bentall y colaboradores [143], en un intento innovador de estudiar los delirios, utilizaron un diseño transdiagnóstico para investigar los factores cognitivos y emocionales relacionados con estos síntomas a lo largo de los trastornos del espectro de la esquizofrenia y en pacientes con depresión. Utilizando modelos de ecuaciones estructurales llegaron a la conclusión de que tanto los factores cognitivos como los factores afectivos contribuyen a la hora de desarrollar y mantener los delirios y lo hacen de manera independiente. Sus análisis mostraron que los delirios están asociados con una combinación de estilos de pensamiento pesimista (baja autoestima, estilo explicativo pesimista, emociones negativas) y una ejecución cognitiva dañada (función ejecutiva, saltar a las conclusiones y teoría de la mente).

Neuropsicología y trastorno delirante.

La precisión y sensibilidad de las técnicas neuropsicológicas las convierte en herramientas con mucho valor a la hora de investigar alteraciones comportamentales pequeñas y algunas veces muy sutiles [144]. Tal y como venimos discutiendo, la investigación en neuropsiquiatría cognitiva ha mostrado que al menos algunos delirios son de origen neuropsicológico [15]. Sin embargo, a lo largo del presente trabajo hemos venido repitiendo el hecho de que la investigación neuropsicológica con personas que sufren trastorno delirante es muy escasa, está fragmentada, las muestras son pequeñas y los resultados están diseminados a lo largo de múltiples teorías y modelos.

Existen muy pocos ejemplos de investigación neuropsicológica en pacientes con trastorno delirante y los describiremos brevemente a continuación.

Evans y colaboradores [145] compararon catorce sujetos con trastorno delirante y cincuenta pacientes diagnosticados con esquizofrenia ajustando la edad y la edad de inicio del trastorno. Estos autores no encontraron diferencias significativas entre ellos en factores tales como la atención, las habilidades motoras, la psicomotricidad, la memoria, la abstracción y la flexibilidad. Las puntuaciones en las tareas neuropsicológicas fueron ligeramente superiores en el grupo de pacientes con trastorno delirante, pero la muestra era demasiado pequeña para que las diferencias fueran estadísticamente significativas.

Herlliz y Forsell [146] estudiaron la memoria episódica de sesenta y seis pacientes ancianos, algunos de los cuales se sospechaba que cumplían criterios para trastorno delirante (n=33). Ellos encontraron que la memoria episódica estaba ligeramente dañada en los pacientes que

se sospechaban con trastorno delirante, particularmente en el recuerdo libre, mientras que no existían otros tipos de déficits cognitivos.

Fujii, y su grupo [147] estudiaron dos pacientes con trastorno delirante de tipo erotomaniaco utilizando del Wisconsin Card Sorting Test (WCST). Encontraron que ambos pacientes mostraban déficits en flexibilidad cognitiva y aprendizaje asociativo, tal y como lo mostraban las puntuaciones en el citado test. Estos resultados sugerían un déficit en la función ejecutiva, lo que replicaba los datos aportados previamente por Jibiki et al. [148] que mostraban una relación entre bajas puntuaciones en el WCST y disfunciones cognitivas frontales en un paciente con delirios monosintomáticos. Fujii y colaboradores concluyeron que la erotomanía podía estar asociada con déficits en flexibilidad cognitiva y aprendizaje asociativo mediados por los sistemas frontales subcorticales. Este déficit en flexibilidad cognitiva podría contribuir al mantenimiento de las creencias delirantes.

Conway y colaboradores [64] no encontraron diferencias significativas en habilidades sensoriales y razonamiento complejo (utilizando el Iowa Gambling Task) entre pacientes con trastorno delirante (n=10) y controles sanos. Estos autores concluyeron que los pacientes con trastorno delirante podrían tener un “set cognitivo” que les predispone a llegar a una conclusión con una evidencia significativamente menor que los sujetos normales. Además, estos resultados sugieren que el estilo de razonamiento se extiende a situaciones y eventos más allá de la temática delirante.

Más recientemente, Lapcin y colaboradores han publicado los resultados de dos estudios en los que comparaban pacientes con trastorno delirante, pacientes con esquizofrenia paranoide, pacientes con esquizofrenia no paranoide y controles sanos en variables neuropsicológicas [91,149]. Por un lado, no encontraron diferencias entre los pacientes con trastorno delirante y pacientes con esquizofrenia de ambos subtipos en atención verbal sostenida, estando todos los grupos por debajo de los controles en las medidas atencionales. Por otro lado, estos autores no encontraron diferencias en aprendizaje verbal y memoria entre pacientes con trastorno delirante y pacientes con esquizofrenia paranoide, pero ambos grupos estaban por debajo de los controles y por encima de los pacientes con esquizofrenia no paranoide. Estos resultados, de nuevo, apoyan la visión de continuo de síntomas y déficit entre la población general y diferentes tipos (o severidad) de trastornos.

Discusión general

La relación entre las lesiones en diferentes regiones del cerebro y los delirios relacionados con el daño cerebral (delirios monotemáticos) se ha comprobado en repetidas ocasiones. Sin embargo, estas mismas regiones no han sido exploradas extensivamente en pacientes con trastorno delirante por el momento. Dado que los deterioros de regiones como el sistema límbico y las estructuras subcorticales del hemisferio izquierdo [43-45] se han relacionado con los delirios monotemáticos, sería interesante estudiar estas mismas regiones en pacientes con trastorno delirante, y esto podría hacerse a través de la evaluación neuropsicológica (por ejemplo, evaluando las funciones ejecutivas). Además, tal y como se ha mencionado anteriormente, la investigación en otras funciones tales como la atención, el aprendizaje, la memoria, la percepción, la planificación y el pensamiento lógico podría darnos algunas pistas de algunos deterioros neuropsicológicos sutiles que podrían estar presentes en individuos con delirios, y que se suponen que están intactos en los pacientes con trastorno delirante (a pesar de que apenas se han investigado). Más aún, las características neuropsicológicas de los pacientes con trastorno delirante podrían ayudar a clarificar el correspondiente

endofenotipo, lo que podría, por su lado, ayudar en la investigación genética tanto de este como de otros trastornos psicóticos [150].

De acuerdo con Maher, los delirios provienen primariamente de anomalías neuropsicológicas que resultan en percepciones anómalas [56-59]. La visión de Maher podría encontrar apoyo empírico si se encontraran estas disfunciones perceptuales de origen neuropsicológico, pero hasta la fecha, esto no se ha investigado en pacientes con trastorno delirante.

Coltheart y colaboradores [69] propusieron que, junto con una anomalía perceptual, un segundo factor debería estar presente para que un delirio ocurriera. Este segundo factor se refiere a un daño en el sistema de evaluación de creencias asociado con el córtex frontal derecho, y, tal y como se ha mencionado anteriormente, esta alteración ya se ha encontrado en los delirios monotemáticos de origen neurofisiológico, pero no ha sido investigado hasta la fecha en pacientes con trastorno delirante. Tal y como ya se ha expuesto, las herramientas neuropsicológicas podrían ayudar a clarificar el papel de esta región en los delirios funcionales.

Con respecto a los sesgos atencionales, se ha encontrado consistentemente que las personas con delirios muestran ante los estímulos amenazantes una percepción exagerada [3,11,78], una excesiva atención [87] y un mayor recuerdo de estos contenidos [83], al tiempo que evitan información que podría desconfirmar sus creencias delirantes [88-90], lo que contribuye a la formación y mantenimiento de los delirios. La investigación neuropsicológica con pacientes diagnosticados con trastorno delirante podría proporcionar información acerca de cómo estos pacientes atienden a la información, tanto si ésta es relevante o no respecto al contenido de su delirio. Si el procesamiento atencional está dañado en estos pacientes independientemente del contenido de la información, esto significaría que la disfuncionalidad no está restringida al delirio y que el déficit cognitivo en los pacientes con trastorno delirante es extensivo en lugar de limitado, pero, de nuevo, esto no ha sido explorado hasta la fecha en pacientes con trastorno delirante.

El papel de los factores afectivos tales como la ansiedad y la depresión en los delirios ha sido estudiado de forma extensiva y a día de hoy es posible concluir que existe una relación circular entre los síntomas y las emociones [4].

Las teorías que se refieren a los déficits o los sesgos en el razonamiento de los pacientes con delirios serían posiblemente las más favorecidas a la hora de beneficiarse de los resultados de la investigación neuropsicológica en los pacientes con trastorno delirante. Hasta la fecha, la investigación ha demostrado consistentemente que existen sesgos de razonamiento en las personas con delirios (tanto en personas con esquizofrenia como en pacientes con trastorno delirante) que se describen más exactamente como sesgos a la hora de recopilar datos, esto es, una tendencia de las personas con delirios a recoger menos evidencia que los controles de modo que "saltan a las conclusiones" [26,123]. Pero este sesgo de saltar a las conclusiones podría depender de factores de impulsividad o motivacionales que todavía no han sido estudiados en pacientes con trastorno delirante [11,151]. Más aún, se ha argumentado que este sesgo de saltar a las conclusiones junto con la necesidad de cierre motivacional, que han sido consistentemente encontrados en pacientes con delirios [115] podrían contribuir de forma conjunta para desarrollar un sistema cognitivo rígido. Sin embargo, la flexibilidad cognitiva no ha sido explorada extensivamente en pacientes con trastorno delirante hasta la fecha.

Asimismo, también se ha encontrado evidencia en apoyo de un sesgo atribucional en personas con delirios persecutorios, lo que les lleva a culpar a agentes externos de los

eventos negativos [78,128], especialmente cuando se trata de información autoreferencial [26]. Además, las personas con delirios persecutorios o de cualquier otro tipo podrían tener dificultades a la hora de representar los estados mentales de los demás (déficits en teoría de la mente), aunque estos déficits podrían estar relacionados con un factor de razonamiento más general. Pero este factor de razonamiento general no ha sido estudiado en pacientes con trastorno delirante por ahora. De este modo, hoy no se puede concluir si los pacientes con trastorno delirante muestran un problema de razonamiento específico o general. Estudiar los déficits atribucionales y de teoría de la mente específicamente en pacientes con trastorno delirante completaría el marco general y aclararía el papel de esos factores en la formación y el mantenimiento de los delirios.

Por último, los estudios más recientes que han utilizado pacientes dentro del espectro de la esquizofrenia han mostrado que los delirios están directamente relacionados con una función ejecutiva dañada [143]. Sin embargo, hasta la fecha, existe una evidencia muy limitada sobre las funciones ejecutivas en los pacientes con trastorno delirante [14]. Dado que éstas están directamente vinculadas a la sintomatología del trastorno delirante, los aspectos de la función ejecutiva tales como la toma de decisiones, la impulsividad, la rigidez, las dificultades en cambiar el foco de atención y los déficits o sesgos de memoria se convierten en aspectos esenciales que deberían ser investigados utilizando medidas neuropsicológicas en pacientes con trastorno delirante.

Conclusiones

La investigación empírica, y, específicamente, la neuropsicológica en pacientes con trastorno delirante es muy infrecuente. Sin embargo, la evaluación neuropsicológica podría suponer un apoyo definitivo a algunas de las teorías que se han mencionado en la presente revisión. Todas las aproximaciones teóricas mencionadas se podrían beneficiar de la investigación de los correlatos neuropsicológicos del trastorno delirante, proporcionando nueva información sobre los delirios que no ha sido ofrecida hasta la fecha.

Estando totalmente de acuerdo con McKay, nosotros también nos preguntamos si la neuropsicología podría dar una explicación adecuada a todos los delirios.

Contribución de los Autores

IIC realizó la revisión bibliográfica y redactó el manuscrito. JACB concibió el estudio, participó en su diseño y ayudó en la redacción del manuscrito. Todos los autores han leído y aprobado el manuscrito final.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación de este estudio por parte del Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación en Red de Salud Mental, CIBERSAM y por parte del Fondo de Investigaciones Sanitarias a través del Proyecto PARAGNOUS.

Referencias

1. Munro A: *Delusional disorder: Paranoia and related illnesses*. New York: Cambridge University Press; 1999.
2. De Portugal E, Cervilla JA: *Trastorno delirante*. Madrid: Grupo Aula Médica; 2004.
3. Gilleen J, David AS: **The cognitive neuropsychiatry of delusions: from psychopathology to neuropsychology and back again**. *Psychol Med* 2005, **35**:5-12.
4. Freeman D: **Suspicious minds: The psychology of persecutory delusions**. *Clin Psychol Rev* 2007, **27**:425-457.
5. Bornstein RA, Nasrallah HA, Olson SC, Coffman JA, Torello M, Schwarzkopf SB: **Neuropsychological deficit in schizophrenic subtypes: paranoid, nonparanoid, and schizoaffective subgroups**. *Psychiatry Research* 1990, **31**:15-24.
6. Golden CJ, Moses JA, Jr., Zelazowski R, Graber B, Zatz LM, Horvath TB, Berger PA: **Cerebral ventricular size and neuropsychological impairment in young chronic schizophrenics. Measurement by the standardized Luria-Nebraska Neuropsychological Battery**. *Arch Gen Psychiatry* 1980, **37**:619-623.
7. Kremen WS, Seidman LJ, Goldstein JM, Faraone SV, Tsuang MT: **Systematized delusions and neuropsychological function in paranoid and nonparanoid schizophrenia**. *Schizophr Res* 1994, **12**:223-236.
8. Langell ME, Purisch AD, Golden CJ: **Neuropsychological Differences Between Paranoid and Nonparanoid Schizophrenics on the Luria-Nebraska Battery**. *International Journal of Clinical Neuropsychology* 1987, **9**:88-94.
9. Paulman RG, Devous MD, Sr., Gregory RR, Herman JH, Jennings L, Bonte FJ, Nasrallah HA, Raese JD: **Hypofrontality and cognitive impairment in schizophrenia: dynamic single-photon tomography and neuropsychological assessment of schizophrenic brain function**. *Biol Psychiatry* 1990, **27**:377-399.
10. Zalewski C, Johnson-Selfridge MT, Ohriner S, Zarrella K, Seltzer JC: **A review of neuropsychological differences between paranoid and nonparanoid schizophrenia patients**. *Schizophr Bull* 1998, **24**:127-145.
11. Bentall RP, Corcoran R, Howard R, Blackwood N, Kinderman P: **Persecutory Delusions: a review and theoretical integration**. *Clin Psychol Rev* 2001, **21**:1143-1192.
12. Freeman D, Garety PA, Kuipers E, Fowler D, Bebbington PE: **A cognitive model of persecutory delusions**. *Br J Clin Psychol* 2002, **41**:331-347.
13. Freeman D, Garety P: *Paranoia: The psychology of Persecutory Delusions*. Hove: Psychology Press; 2004.
14. Kunert HJ, Norra C, Hoff P: **Theories of delusional disorders - An update and review**. *Psychopathology* 2007, **40**:191-202.
15. McKay R, Langdon R, Coltheart M: **Models of misbelief: Integrating motivational and deficit theories of delusions**. *Conscious Cogn* 2007, **16**:932-941.
16. Kraepelin E: *Lehrbuch der Psychiatrie, 5th edn*. Leipzig: Barth; 1896.
17. Bleuler E: *Dementia Praecox or the group of Schizophrenias*. London: Allen & Unwin; 1951.
18. Kendler KS: **The nosologic validity of paranoia (simple delusional disorder). A review**. *Arch Gen Psychiatry* 1980, **37**:699-706.
19. Munro A: **Paranoia revisited**. *Br J Psychiatry* 1982, **158**:593-601.
20. Winokur G: **Delusional disorder (paranoia)**. *Comprehensive Psychiatry* 1977, **18**:511-521.
21. American Psychiatric Association: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd edn. revised (DSM-III-R)*. Washington, DC: 1987.

22. American Psychiatric Association: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edn (DSM-IV)*. Washington, D.C.: 1994.
23. American Psychiatric Association: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edn, text revision (DSM-IV-TR)*. Washington, D.C.: 2000.
24. Abdel-Hamid M, Brune M: **Neuropsychological aspects of delusional disorder**. *Current Psychiatry Reports* 2008, **10**:229-234.
25. Bell V, Halligan PW, Ellis HD: **Explaining delusions: a cognitive perspective**. *Trends in Cognitive Sciences* 2006, **10**:219-226.
26. Garety PA, Freeman D: **Cognitive approaches to delusions: a critical review of theories and evidence**. *Br J Clin Psychol* 1999, **38 (Pt 2)**:113-154.
27. Oltmanns TF: **Approaches to the definition and study of delusions**. In *Delusional beliefs*. Edited by Edited by Oltmanns TF, Maher BA. New York: Wiley; 1988:3-12.
28. Bentall RP: **The syndromes and symptoms of psychosis. Or why you can't play "twenty questions" with the concept of schizophrenia and hope to win**. In *Reconstructing schizophrenia*. Edited by Edited by Bentall RP. London: Routledge; 1990:23-60.
29. Myin-Germeys I, Krabbendam L: **Continuity of psychotic symptoms in the community**. *Current Opinion in Psychiatry* 2003, **16**:443-449.
30. Kendler KS: **Demography of paranoid psychosis (delusional disorder): a review and comparison with schizophrenia and affective illness**. *Arch Gen Psychiatry* 1982, **39**:890-902.
31. De Portugal E, Gonzalez N, Haro JM, Autonell J, Cervilla JA: **A descriptive case-register study of delusional disorder**. *European Psychiatry* 2008, **23**:125-133.
32. De Portugal E, Gonzalez N, Vilaplana M, Haro JM, Usall J, Cervilla J: **Un estudio empirico de los correlatos psicosociales y clinicos del trastorno delirante: el estudio DELIREMP**. *Revista de Psiquiatría y Salud Mental* 2009, **2**:72-82.
33. Maina G, Albert U, Bada A, Bogetto F: **Occurrence and clinical correlates of psychiatric co-morbidity in delusional disorder**. *European Psychiatry* 2001, **16**:222-228.
34. Serretti A, Lattuada E, Cusin C, Smeraldi E: **Factor analysis of delusional disorder symptomatology**. *Comprehensive Psychiatry* 1999, **40**:143-147.
35. Yamada N, Nakajima S, Noguchi T: **Age at onset of delusional disorder is dependent on the delusional theme**. *Acta Psychiatr Scand* 1998, **97**:122-124.
36. Grover S, Biswas P, Avasthi A: **Delusional disorder: Study from North India**. *Psychiatry Clin Neurosci* 2007, **61**:462-470.
37. Hsiao MC, Liu CY, Yang YY, Yeh EK: **Delusional disorder: retrospective analysis of 86 Chinese outpatients**. *Psychiatry Clin Neurosci* 1999, **53**:673-676.
38. Langdon R, Coltheart M: **The cognitive neuropsychology of delusions**. *Mind & Language* 2000, **15**:184-218.
39. Freeman D, Garety P: **Worry, worry processes and dimensions of delusions: An exploratory investigation of a role for anxiety processes in the maintenance of delusional distress**. *Behavioural and Cognitive Psychotherapy* 1999, **27**:47-62.
40. Bentall RP, Kinderman P, Kaney S: **The self, attributional processes and abnormal beliefs: Towards a model of persecutory delusions**. *Behaviour Research and Therapy* 1994, **32**:331-341.
41. Johns LC, Cannon M, Singleton N, Murray RM, Farrell M, Brugha T, Bebbington P, Jenkins R, Meltzer H: **Prevalence and correlates of self-reported psychotic symptoms in the British population**. *Br J Psychiatry* 2004, **185**:298-305.

42. van Os J: **Is there a continuum of psychotic experiences in the general population?** *Epidemiol Psychiatr Soc* 2003, **12**:242-252.
43. Cummings JL: **Organic delusions: phenomenology, anatomical correlations, and review.** *Br J Psychiatry* 1985, **146**:184-197.
44. Cummings JL: **Psychosis in neurologic disease - neurobiology and pathogenesis.** *Neuropsychiatry Neuropsychology and Behavioral Neurology* 1992, **5**:144-150.
45. Davison K, Bagley CR: **Schizophrenia-like psychoses associated with organic disorders of the central nervous system: a review of the literature.** *Br J Psychiatry* 1969, **4**:113-184.
46. Cutting J: *The right cerebral hemisphere and psychiatric disorders.* Oxford, UK: Oxford University Press; 1990.
47. Ellis HD: **The Role of the Right-Hemisphere in the Capgras Delusion.** *Psychopathology* 1994, **27**:177-185.
48. Coltheart M: **The 33rd Sir Frederick Bartlett Lecture - Cognitive neuropsychiatry and delusional belief.** *Q J Exp Psychol* 2007, **60**:1041-1062.
49. Feinberg TE, Roane DM: **Delusional misidentification.** *Psychiatric Clinics of North America* 2005, **28**:665-683.
50. Nakano S, Yamashita F, Matsuda H, Kodama C, Yamada T: **Relationship between delusions and regional cerebral blood flow in Alzheimer's disease.** *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006, **21**:16-21.
51. Pia L, Neppi-Modona M, Ricci R, Berti A: **The anatomy of anosognosia for hemiplegia: a meta-analysis.** *Cortex* 2004, **40**:367-377.
52. Mucci A, Galderisi S, Bucci P, Tresca E, Forte A, Koenig T, Maj M: **Hemispheric lateralization patterns and psychotic experiences in healthy subjects.** *Psychiatry Research* 2005, **139**:141-154.
53. Morimoto K, Miyatake R, Nakamura M, Watanabe T, Hirao T, Suwaki H: **Delusional disorder: molecular genetic evidence for dopamine psychosis.** *Neuropsychopharmacology* 2002, **26**:794-801.
54. Myin-Germeys I, Marcelis M, Krabbendam L, Delespaul P, van OJ: **Subtle fluctuations in psychotic phenomena as functional states of abnormal dopamine reactivity in individuals at risk.** *Biol Psychiatry* 2005, **58**:105-110.
55. De Portugal E, Cervilla J: **Trastorno delirante desde un punto de vista empírico.** *Monografías de Psiquiatría* 2007, **19**:3-18.
56. Maher B: **Delusional thinking and perceptual disorder.** *J Individ Psychol* 1974, **30**:98-113.
57. Maher B: **Anomalous experience and delusional thinking: the logic of explanations.** In *Delusional beliefs.* Edited by Edited by Oltmanns TF, Maher B. New York: Wiley; 1988:15-33.
58. Maher B: **Psychopathology and delusions: reflections on methods and models.** In *Principles of experimental psychopathology: Essays in honor of Brendan A. Maher.* Edited by Edited by Lenzenweger MF, Hooley JM. Washington: American Psychological Association; 2003:9-28.
59. Maher B: **Delusional thinking and cognitive disorder.** *Integr Physiol Behav Sci* 2005, **40**:136-146.
60. Ellis HD, Young AW, Quayle AH, De Pauw KW: **Reduced autonomic responses to faces in Capgras delusion.** *Proc Biol Sci* 1997, **264**:1085-1092.
61. Frith C, Done DJ: **Routes to action in reaction time tasks.** *Psychol Res* 1986, **48**:169-177.

62. Frith C, Done DJ: **Experiences of alien control in schizophrenia reflect a disorder in the central monitoring of action.** *Psychol Med* 1989, **19**:359-363.
63. Frith CD: *The cognitive neuropsychology of schizophrenia*. Hove: LEA; 1992.
64. Conway CR, Bollini AM, Graham BG, Keefe RS, Schiffman SS, McEvoy JP: **Sensory acuity and reasoning in delusional disorder.** *Comprehensive Psychiatry* 2002, **43**:175-178.
65. Bell V, Halligan PW, Ellis HD: **The Cardiff Anomalous Perceptions Scale (CAPS): A new validated measure of anomalous perceptual experience.** *Schizophr Bull* 2006, **32**:366-377.
66. Bell V, Halligan PW, Ellis HD: **Are anomalous perceptual experiences necessary for delusions?** *The Journal of Nervous and Mental Disease* 2008, **196**:3-8.
67. Tranel D, Damasio H, Damasio AR: **Double Dissociation Between Overt and Covert Face Recognition.** *J Cogn Neurosci* 1995, **7**:425-432.
68. Davies M, Coltheart M, Langdon R, Breen N: **Monothematic delusions: towards a two-factor account.** *Philosophy, Psychiatry, and Psychology* 2001, **15**:133-158.
69. Coltheart M, Langdon R, McKay R: **Schizophrenia and Monothematic Delusions.** *Schizophr Bull* 2007, **642**-647.
70. Burgess PW, Baxter D, Rose M, Alderman N: **Delusional paramnesic misidentification.** In *Method in madness*. Edited by Edited by Halligan PW, Marshall C. Hove: Psychology Press; 1996.
71. Papageorgiou P, Ventouras E, Lykouras L, Uzunoglu N, Christodoulou GN: **Psychophysiological evidence for altered information in delusional misidentification syndromes.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003, **27**:365-372.
72. Staff RT, Shanks MF, Macintosh L, Pestell SJ, Gemmell HG, Venneri A: **Delusions in Alzheimer's disease: SPET evidence of right hemispheric dysfunction.** *Cortex* 1999, **35**:549-560.
73. Fennig S, Naisberg-Fennig S, Bromet E: **Capgras syndrome with right frontal meningioma.** *Harefuah* 1994, **126**:320-321.
74. Joséph A: **Cotard's syndrome in a patient with coexistent Capgras's syndrome, syndrome of subjective doubles, and palinopsia.** *J Clin Psychiatry* 1986, **47**:605-696.
75. Joséph A, O'Leary DH, Wheeler HG: **Bilateral atrophy of the frontal and temporal lobes in schizophrenic patients with Capgras syndrome: a case-control study using computed tomography.** *J Clin Psychiatry* 1990, **51**:322-325.
76. Spangenberg KB, Wagner MT, Bachman DL: **Neuropsychological analysis of a case of abrupt onset mirror sign following a hypotensive crisis in a patient with vascular dementia.** *Neurocase* 1998, **4**:149-154.
77. Young AW, Robertson IH, Hellawell DJ, Depauw KW, Pentland B: **Cotard Delusion After Brain Injury.** *Psychol Med* 1992, **22**:799-804.
78. Fear C, Sharp H, Healy D: **Cognitive processes in delusional disorders.** *Br J Psychiatry* 1996, **168**:61-67.
79. Bommer I, Brune M: **Social cognition in "pure" delusional disorder.** *Cognitive Neuropsychiatry* 2006, **11**:493-503.
80. Freeman D, Garety PA, Phillips ML: **An examination of hypervigilance for external threat in individuals with generalized anxiety disorder and individuals with persecutory delusions using visual scan paths.** *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section A-Human Experimental Psychology* 2000, **53**:549-567.
81. Green MJ, Williams LM, Davidson D: **Visual scanpaths to threat-related faces in deluded schizophrenia.** *Psychiatry Research* 2003, **119**:271-285.

82. Phillips ML, David AS: **Visual scan paths are abnormal in deluded schizophrenics.** *Neuropsychologia* 1997, **35**:99-105.
83. Blackwood NJ, Howard RJ, Bentall RP, Murray RM: **Cognitive neuropsychiatric models of persecutory delusions.** *Am J Psychiatry* 2001, **158**:527-539.
84. Green MJ, Phillips ML: **Social threat perception and the evolution of paranoia.** *Neurosci Biobehav Rev* 2004, **28**:333-342.
85. Kinderman P, Prince S, Waller G, Peters E: **Self-discrepancies, attentional bias and persecutory delusions.** *Br J Clin Psychol* 2003, **42**:1-12.
86. Galbraith N, Manktelow K, Morris N: **Subclinical delusional ideation and a self-reference bias in everyday reasoning.** *Br J Psychol* 2008, **99**:29-44.
87. Wessely S, Buchanan A, Reed A, Cutting J, Everitt B, Garety P, Taylor PJ: **Acting on Delusions .1. Prevalence.** *Br J Psychiatry* 1993, **163**:69-76.
88. Woodward TS, Moritz S, Cuttler C, Whitman JC: **The contribution of a cognitive bias against disconfirmatory evidence (BADE) to delusions in schizophrenia.** *J Clin Exp Neuropsychol* 2006, **28**:605-617.
89. Buchy L, Woodward TS, Liotti M: **A cognitive bias against disconfirmatory evidence (BADE) is associated with schizotypy.** *Schizophrenia Research* 2007, **90**:334-337.
90. Woodward TS, Buchy L, Moritz S, Liotti M: **A Bias Against Disconfirmatory Evidence Is Associated With Delusion Proneness in a Nonclinical Sample.** *Schizophr Bull* 2007, **33**:1023-1028.
91. Lapcin S, Guler J, Ceylan E, Maner F, Ger C, Satmis N: **Attention impairment in patients with paranoid schizophrenia and delusional disorder: A controlled study.** *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2008, **11**:251.
92. Birchwood M: **Pathways to emotional dysfunction in first episode psychosis.** *Br J Psychiatry* 2003, **182**:373-375.
93. Freeman D, Garety P: **Connecting neurosis and psychosis: The direct influence of emotion on delusions and hallucinations.** *Behaviour Research and Therapy* 2003, **41**:923-947.
94. Freeman D, Garety P: **Comments on the content of persecutory delusions: Does the definition need clarification?** *Br J Clin Psychol* 2000, **39**:407-414.
95. Freeman D, Garety P, Kuipers E: **Persecutory delusions: developing the understanding of belief maintenance and emotional distress.** *Psychol Med* 2001, **31**:1293-1306.
96. Schulze TG, Ohlraun S, Czerski PM, Schumacher J, Kassem L, Deschner M, Gross M, Tullius M, Heidmann V, Kovalenko S et al.: **Genotype-phenotype studies in bipolar disorder showing association between the DAOA/G30 locus and persecutory delusions: a first step toward a molecular genetic classification of psychiatric phenotypes.** *Am J Psychiatry* 2005, **162**:2101-2108.
97. Startup H, Freeman D, Garety PA: **Persecutory delusions and catastrophic worry in psychosis: developing the understanding of delusion distress and persistence.** *Behaviour Research and Therapy* 2007, **45**:523-537.
98. Freeman D, Garety P, Fowler D, Kuipers E, Dunn G, Bebbington P, Hadley G: **The London East Anglia randomized controlled trial of cognitive-behaviour therapy for psychosis IV: Self-esteem and persecutory delusions.** *Br J Clin Psychol* 1998, **37**:415-430.
99. Candido CL, Romney DM: **Attributional Style in Paranoid Vs Depressed-Patients.** *Br J Med Psychol* 1990, **63**:355-363.
100. Ellett L, Lopes B, Chadwick P: **Paranoia in a non-clinical population of college students.** *J Nerv Ment Dis* 2003, **191**:425-430.

101. Freeman D, Dunn G, Garety PA, Bebbington P, Slater M, Kuipers E, Fowler D, Green C, Jordan J, Ray K: **The psychology of persecutory ideation I: a questionnaire survey.** *J Nerv Ment Dis* 2005, **193**:302-308.
102. Martin JA, Penn DL: **Social cognition and subclinical paranoid ideation.** *Br J Clin Psychol* 2001, **40**:261-265.
103. McKay R, Langdon R, Coltheart M: **Paranoia, persecutory delusions and attributional bias.** *Psychiatry Research* 2005, **136**:233-245.
104. Moritz S, Werner R, von Collani G: **The inferiority complex in paranoia readdressed: a study with the Implicit Association Test.** *Cognitive Neuropsychiatry* 2006, **11**:402-415.
105. Greenwald AG, Mcghee DE, Schwartz JLK: **Measuring individual differences in implicit cognition: The implicit association test.** *J Pers Soc Psychol* 1998, **74**:1464-1480.
106. Lee H: **Attentional bias, memory bias and the self-concept in paranoia.** *Psychol Med* 2000, **9**:77-99.
107. Krstev H, Jackson H, Maude D: **An investigation of attributional style in first-episode psychosis.** *Br J Clin Psychol* 1999, **38**:181-194.
108. Martin JA, Penn DL: **Attributional style in schizophrenia: An investigation in outpatients with and without persecutory delusions.** *Schizophr Bull* 2002, **28**:131-141.
109. Kinderman P, Kaney S, Morley S, Bentall RP: **Paranoia and the Defensive Attributional Style - Deluded and Depressed-Patients Attributions About Their Own Attributions.** *Br J Med Psychol* 1992, **65**:371-383.
110. Lyon HM, Kaney S, Bentall RP: **The Defensive Function of Persecutory Delusions Evidence from Attribution Tasks.** *Br J Psychiatry* 1994, **164**:637-646.
111. Trower P, Chadwick P: **Pathways to Defense of the Self - A Theory of 2 Types of Paranoia.** *Clinical Psychology-Science and Practice* 1995, **2**:263-278.
112. Chadwick PDJ, Trower P, Juusti-Butler TM, Maguire N: **Phenomenological evidence for two types of paranoia.** *Psychopathology* 2005, **38**:327-333.
113. Melo SS, Taylor JL, Bentall RP: **'Poor me' versus 'bad me' paranoia and the instability of persecutory ideation.** *Psychology and Psychotherapy-Theory Research and Practice* 2006, **79**:271-287.
114. Bentall RR, Kaney S: **Attributional lability in depression and paranoia.** *Br J Clin Psychol* 2005, **44**:475-488.
115. Colbert SM, Peters ER: **Need for closure and jumping-to-conclusions in delusion-prone individuals.** *J Nerv Ment Dis* 2002, **190**:27-31.
116. Kruglanski AW: *Lay epistemics and human knowledge: cognitive and motivational bases.* New York: Plenum; 1989.
117. Webster DM, Kruglanski AW: **Individual differences in need for cognitive closure.** *Journal of Personality and Social Psychology* 1994, **67**:1049-1062.
118. Bentall RP, Swarbrick R: **The best laid schemas of paranoid patients: Autonomy, sociotropy and need for closure.** *Psychology and Psychotherapy-Theory Research and Practice* 2003, **76**:163-171.
119. Colbert SM, Peters ER, Garety PA: **Need for closure and anxiety in delusions: A longitudinal investigation in early psychosis.** *Behaviour Research and Therapy* 2006, **44**:1385-1396.
120. Freeman D, Garety P, Kuipers E, Colbert S, Jolley S, Fowler D, Dunn G, Bebbington P: **Delusions and decision-making style: use of the Need for Closure Scale.** *Behav Res Ther* 2006, **44**:1147-1158.

121. Mckay R, Langdon R, Coltheart M: **Need for closure, jumping to conclusions, and decisiveness in delusion-prone individuals.** *J Nerv Ment Dis* 2006, **194**:422-426.
122. Kemp R, Chua S, Mckenna P, David AS: **Reasoning in delusions: an empirical study.** *Br J Psychiatry* 1997, **170**:398-405.
123. Garety PA, Freeman D, Jolley S, Dunn G, Bebbington PE, Fowler DG, Kuipers E, Dudley R: **Reasoning, emotions, and delusional conviction in psychosis.** *J Abnorm Psychol* 2005, **114**:373-384.
124. Moritz S, Woodward TS: **Jumping to conclusions in delusional and non-delusional schizophrenic patients.** *Br J Clin Psychol* 2005, **44**:193-207.
125. Peters E, Garety P: **Cognitive functioning in delusions: a longitudinal analysis.** *Behaviour Research and Therapy* 2006, **44**:481-514.
126. Van Dael F, Versmissen D, Janssen I, Myin-Germeyns I, van Os J, Krabbendam L: **Data gathering: Biased in psychosis?** *Schizophr Bull* 2006, **32**:341-351.
127. Moritz S, Lincoln T: **Kognitive Korrelate des schizophrenen Wahns.** In *Neuropsychologie der Schizophrenie*. Edited by Edited by Kirchner TT, Gauggel S. Berlin: Springer; 2008:456-467.
128. Sharp H, Fear C, Healy D: **Attributional style and delusions: an investigation based on delusional content.** *European Psychiatry* 1997, **12**:1-7.
129. Bommer I, Brune M: **Neuropsychological aspects of delusional disorders. Characteristic attributional style or cognitive deficit?** *Nervenarzt* 2007, **78**:796-801.
130. Janssen I, Versmissen D, Campo JA, Myin-Germeyns I, van Os J, Krabbendam L: **Attribution style and psychosis: evidence for an externalizing bias in patients but not in individuals at high risk.** *Psychol Med* 2006, **36**:771-778.
131. Langdon R, Corner T, McLaren J, Ward PB, Coltheart M: **Externalizing and personalizing biases in persecutory delusions: the relationship with poor insight and theory-of-mind.** *Behaviour Research and Therapy* 2006, **44**:699-713.
132. Frith U, Frith CD: **Development and neurophysiology of mentalizing.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 2003, **358**:459-473.
133. Pickup GJ, Frith CD: **Theory of mind impairments in schizophrenia. Symptomatology, severity and specificity.** *Psychol Med* 2001, **31**:207-220.
134. Brune M: **"Theory of mind" in schizophrenia: A review of the literature.** *Schizophr Bull* 2005, **31**:21-42.
135. Frith CD: **Schizophrenia and theory of mind.** *Psychol Med* 2004, **34**:385-389.
136. Kelemen O, Keri S, Must A, Benedek G, Janka Z: **No evidence for impaired 'theory of mind' in unaffected first-degree relatives of schizophrenia patients.** *Acta Psychiatr Scand* 2004, **110**:146-149.
137. Walston F, Blennerhassett RC, Charlton BG: **"Theory of mind", persecutory delusions and the somatic marker mechanism.** *Cognitive Neuropsychiatry* 2000, **5**:161-174.
138. Freeman D, Garety P, Kuipers E, Colbert S, Jolley S, Fowler D, Dunn G, Bebbington P: **Delusions and decision-making style: Use of the need for closure scale.** *Behaviour Research and Therapy* 2006, **44**:1147-1158.
139. Freeman D, Garety PA, Fowler D, Kuipers E, Bebbington PE, Dunn G: **Why do people with delusions fail to choose more realistic explanations for their experiences? An empirical investigation.** *J Consult Clin Psychol* 2004, **72**:671-680.
140. Freeman D, Garety PA, McGuire P, Kuipers E: **Developing a theoretical understanding of therapy techniques: an illustrative analogue study.** *Br J Clin Psychol* 2005, **44**:241-254.
141. Clark DM: **Anxiety disorders: Why they persist and how to treat them.** *Behaviour Research and Therapy* 1999, **37**:S5-S27.

142. Hemsley DR: **Perceptual and cognitive abnormalities as the bases for schizophrenic symptoms.** In *The neuropsychology of schizophrenia*. Edited by Edited by David AS, Cutting JC. Hove: Erlbaum; 1994:97-116.
143. Bentall RP, Rowse G, Shryane N, Kinderman P, Howard R, Blackwood N, Moore R, Corcoran R: **The cognitive and affective structure of paranoid delusions: a transdiagnostic investigation of patients with schizophrenia spectrum disorders and depression.** *Arch Gen Psychiatry* 2009, **66**:236-247.
144. Lezak M: *Neuropsychological assessment (4th ed.)*. New York: The Guilford Press.; 2004.
145. Evans JD, Paulsen JS, Harris MJ, Heaton RK, Jeste DV: **A clinical and neuropsychological comparison of delusional disorder and schizophrenia.** *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1996, **8**:281-286.
146. Herlitz A, Forsell Y: **Episodic memory deficit in elderly adults with suspected delusional disorder.** *Acta Psychiatr Scand* 1996, **93**:355-361.
147. Fujii DE, Ahmed I, Takeshita J: **Neuropsychologic implications in erotomania: two case studies.** *Neuropsychiatry Neuropsychology and Behavioral Neurology* 1999, **12**:110-116.
148. Jibiki I, Kagara Y, Kishizawa S, Kurokawa K, Fukushima T, Furuta H, Yamaguchi N: **Case-Study of Monosymptomatic Delusion of Unpleasant Body Odor with Structural Frontal Abnormality.** *Neuropsychobiology* 1994, **30**:7-10.
149. Lapcin S, Guler J, Maner F, Ceylan E, Keskinilic C, Satmis N, Ergen N: **Verbal learning and verbal memory deficits in patients with paranoid schizophrenia and delusional disorder: A controlled study.** *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2008, **11**:251.
150. Cannon TD, Keller MC: **Endophenotypes in the genetic analyses of mental disorders.** *Ann Rev Clin Psych* 2006, **2**:267-290.
151. Bottlender R, Buchberger A, Hoff P, Moller HJ: **Decision-making and delusion. A study on decision-making in deluded, depressive and healthy subjects.** *Nervenarzt* 1999, **70**:987-992.

CAPITULO 5

*Efectos del envejecimiento en la percepción y
atención visual humanos*

*J.M. Rodríguez-Ferrer
R. Mancebo-Azor
R. Gutiérrez
M.A. Pugnaire
L.F. Canava*

Efectos del envejecimiento en la percepción y atención visual humanos

José M. Rodríguez-Ferrer, Rafael Mancebo-Azor, Raquel Gutiérrez, Miguel A. Pugnaire, Luís F Canaval

Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva. Instituto de Neurociencias. Universidad de Granada.

Dirección de correo electrónico:

JMRF: jmferrer@ugr.es

Resumen

Introducción. La detección visual de estímulos depende fundamentalmente del contraste y excentricidad en el campo visual de los mismos. En personas jóvenes, se ha mostrado que la detección de los estímulos empeora conforme disminuye el contraste y aumenta la excentricidad de los estímulos. **Objetivo.** Estudiar los efectos de la edad en la detección de estímulos que varían en contraste y excentricidad, así como los efectos de la atención encubierta en la detección de los mismos. **Métodos.** En dos grupos de voluntarios con visión normal y edades medias de 19 y 66 años, respectivamente, se estudiaron los tiempos de respuesta a la presentación de estímulos (círculos grises de 0.5º de diámetro) presentados en tres excentricidades (2.15, 3.83 y 5.53º) y con tres niveles de contraste (6, 16 y 78%). **Resultados.** En ambos grupos de edad, los tiempos de respuesta se incrementaron conforme disminuyó el contraste y aumentó la excentricidad de los estímulos. En comparación con los jóvenes, el grupo de mayor edad mostró tiempos de respuesta superiores en todos los estímulos, siendo este aumento significativo en los de menor contraste (6%). En los jóvenes, la atención encubierta redujo los tiempos de respuesta en todos los estímulos presentados, mientras que en el de mayores, la reducción se observó fundamentalmente en los estímulos de mayor excentricidad. **Conclusiones.** La edad retarda la detección visual de los estímulos, especialmente los de bajo contraste y focaliza los beneficios de la atención visual encubierta a los estímulos de mayor excentricidad.

Palabras clave. Atención encubierta. Envejecimiento. Tiempo de respuesta. Visión.

Introducción

En un estudio realizado en adultos jóvenes hemos mostrado un método sencillo para estudiar cómo el contraste y la excentricidad de los estímulos, presentados en la retina central, influyen en su detección por el sistema visual [1]. Así, hemos demostrado que la disminución del contraste y el aumento de la excentricidad de los estímulos en el campo visual disminuyen la detección de los mismos, reflejado por un aumento de los tiempos de respuesta tras su presentación.

Manteniendo la mirada fija en un punto del campo visual, somos capaces de prestar atención a objetos situados en zonas periféricas al punto de fijación. Esto se conoce como atención encubierta [2]. Diversos estudios han evidenciado que la atención encubierta a estímulos visuales mejora su detección y percepción. Así, se ha mostrado que la atención aumenta la percepción del contraste de luminancia [3,4,5] y de color [6] de los estímulos. La atención también mejora la localización de los estímulos visuales atendidos dentro de una escena visual compleja [7]. La atención visual espacial depende, fundamentalmente, de la activación de áreas parietales dorsales y frontales dorsolaterales y de sus conexiones con la corteza visual [7,8,9].

La atención visual encubierta forma parte de lo que se denominan como procesos cognitivos cerebrales. Las capacidades cognitivas humanas están influenciadas por la edad y muestran un proceso de desarrollo en los primeros años de vida que depende de la maduración y refinamiento de circuitos cerebrales específicos [10]. La actividad de estos circuitos se altera con el envejecimiento, lo que conlleva el deterioro de los procesos cognitivos asociados. El modelo experimental de detección visual desarrollado por nosotros [1] es especialmente apropiado para el estudio de la atención encubierta. Dado que la atención mejora la percepción de los estímulos, cabría esperar que los tiempos de respuesta a la presentación de los estímulos disminuyan cuando estos son atendidos. Por otra parte, los efectos beneficiosos de la atención pueden verse afectados por el envejecimiento normal. El presente trabajo ha analizado en primer lugar los efectos de la edad en la detección de estímulos visuales, que varían en contraste y excentricidad en el campo visual. En segundo lugar, se han investigado los efectos del envejecimiento en la atención visual. Para ello, el estudio se ha realizado en adultos jóvenes y en mayores de 60 años.

Métodos

Dos grupos de 20 voluntarios sanos han participado en el presente estudio. El primer grupo estuvo constituido por 10 hombres y 10 mujeres, con edades comprendidas entre 19 y 20 años (media \pm desviación típica 19.05 \pm 0.05 años). El segundo grupo lo constituyeron 10 hombres y 10 mujeres, con edades comprendidas entre 60 y 73 años (66.4 \pm 0.7 años). Todos los sujetos presentaron una agudeza visual normal y dieron su conformidad por escrito para participar en los experimentos.

Estímulos y procedimiento. En condiciones fotópicas (habitación con luz artificial atenuada) los participantes se sentaron a una distancia de 114.5 cm frente a un monitor de rayos catódicos de 24x32 cm, esto subtende un ángulo visual de 11.84x15.61°. Sobre un fondo gris, con luminancia de 28.87 Cd/m², se presentó en el centro de la pantalla una cruz roja de un

tamaño de 0.5 grados de ángulo visual. El monitor se desplazó verticalmente hasta situar la cruz a la altura de los ojos de cada sujeto.

En una primera prueba, utilizada como control, se estudió la detección de estímulos visuales que variaron en su contraste, y localización en el campo visual. Consistió en responder apretando el botón de un mando a la presentación de los estímulos, manteniendo la mirada fija en la cruz central durante la realización de la misma. Los estímulos, un círculo gris con un diámetro de 0.5 grados de ángulo visual, se presentaron de forma secuencial para cada una de las 24 posiciones utilizadas, distribuidas en 8 coordenadas polares (0, 45, 90, 135, 180, 225, 270 y 315 grados de una circunferencia) y 3 excentricidades (2.15, 3.83 y 5.53 grados de ángulo visual). En cada posición, el estímulo se presentó durante 100 ms, con 3 niveles de luminancia (3.57, 20.90, y 25.60 Cd/m²). En total se presentaron 72 estímulos a cada uno de los 40 participantes (Fig. 1).

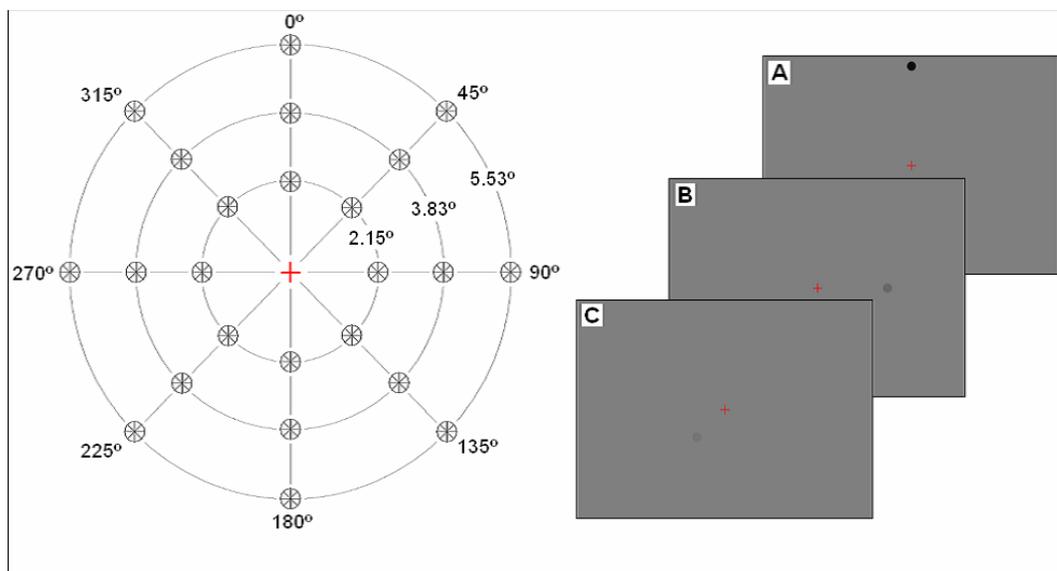


Figura 1. Diagrama que muestra el punto de fijación de la mirada (cruz central) y las 24 posiciones donde se presentaron los estímulos con tres niveles de contraste. En la parte derecha de la figura se muestran tres ejemplos de estímulos utilizados: A) estímulo de 5.53° de excentricidad y 78% de contraste; B) estímulo de 3.83° de excentricidad y 16% de contraste; C) estímulo de 2.15° de excentricidad y 6% de contraste.

Seguidamente, en una segunda prueba se estudiaron los efectos de la atención encubierta en la detección de los estímulos. En este caso, los estímulos (de tamaño, y luminancias idénticas al experimento anterior) sólo se presentaron en la coordenada polar de 90°, en las tres excentricidades anteriores. Con el objeto de presentar un número de estímulos igual de la prueba de detección, cada estímulo se presentó 8 veces. Para favorecer la atención encubierta, antes de la presentación de los estímulos en cada excentricidad, se mostró durante 100 ms una flecha horizontal señalando la coordenada de 90° en la que iban a aparecer los estímulos (Fig. 2). La prueba consistió en responder apretando el botón de un mando a la presentación de los estímulos, manteniendo la mirada fija en la cruz central durante la realización de la misma pero prestando atención encubierta a la zona de presentación de los estímulos indicada por la flecha. Con el objeto de evaluar la influencia del aprendizaje o de la fatiga en la realización de los dos experimentos anteriores, terminada la prueba de atención, se repitió la prueba inicial de detección de estímulos.

El contraste (C) entre los estímulos y el fondo viene determinado por la fórmula de Michelson: $C = [(L_f - L_e) / (L_f + L_e)] \times 100$, donde L_f es la luminancia del fondo y L_e la luminancia del estímulo. Siguiendo esta fórmula se obtienen tres niveles de contraste entre cada uno de los estímulos y el fondo de pantalla (6%, 16% y 78%). El orden de

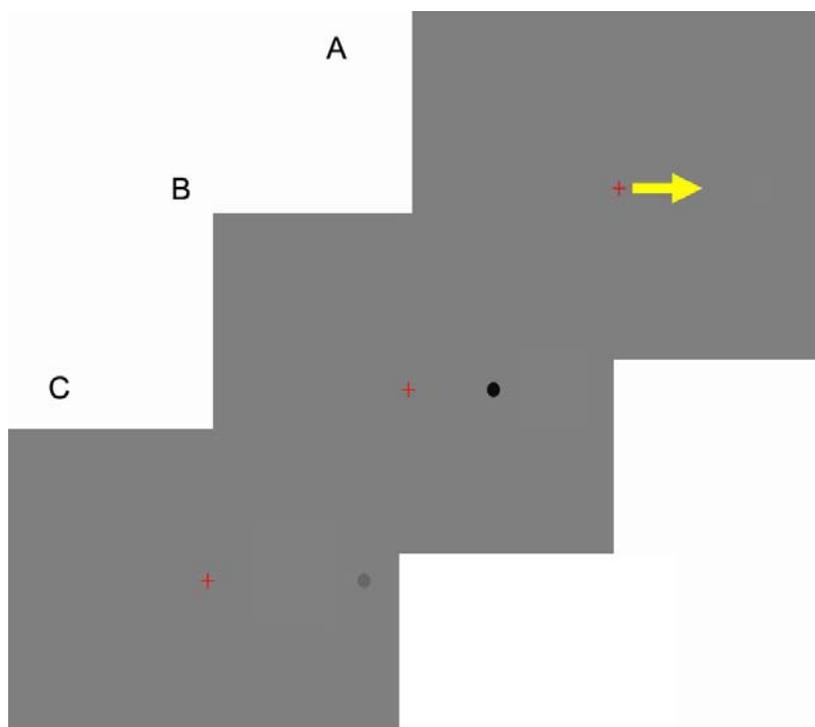


Figura 2. Ejemplo de la prueba de atención encubierta utilizada. A) pantalla con la cruz central para fijación de la mirada y con la flecha que indica la coordenada de 90º en la que aparecerán posteriormente los estímulos a detectar y donde los participantes deben focalizar su atención. B) y C) dos de los estímulos presentados en la coordenada objeto de atención.

presentación y tiempo interestímulos (entre 500 y 3000 ms) fue determinado al azar mediante la aplicación informática EEVOKE en su versión 2 (ANT software BV. Enschede, Países Bajos). Los tiempos de respuesta (TR) se registraron mediante el programa ASA en su versión 3 (Advance Source Analysis, ANT software BV). Los movimientos oculares se detectaron mediante 4 electrodos de superficie (Tyco Internacional Ltd. Neustadt/Donau, Alemania) conectados a un sistema de registro (ANT software BV). Dos electrodos, uno en el borde orbital externo izquierdo y otro en el derecho, registraron los movimientos oculares horizontales. Los movimientos verticales y parpadeos se registraron mediante dos electrodos situados uno en el borde orbital superior izquierdo y otro en el inferior derecho.

Antes de iniciar las pruebas, los participantes fueron instruidos para que respondieran lo más rápido posible y solamente ante la presencia de dichos estímulos. En base a los registros electrooculográficos, fueron informados del correcto mantenimiento de la mirada en el punto de fijación. Para la medida y ajuste de las luminancias se utilizó un luminancímetro (Konica-Minolta, modelo LS-100).

El Análisis estadístico de los Datos se llevó a cabo mediante el Paquete de programas estadísticos SPSS, versión 15.0. Tras la exploración de datos y la aplicación del Test de Normalidad de Shapiro-Wilk, se procedió a la aplicación del módulo del modelo lineal general para medidas repetidas, considerando como factores intrasujeto la posición (8 posiciones

diferentes), excentricidad (3 niveles, 2.15°, 3.83° y 5.53°), contraste (3 niveles, 6%, 16% y 78%) y las tres fases de aplicación del experimento en cada una de las condiciones control, atención y control post atención, lo que para cada sujeto conduce a 216 medidas de tiempo de respuesta en milisegundos, que es la variable a analizar. Al existir dos grupos de sujetos a comparar según su edad, se consideró esta como factor inter-sujetos con dos niveles (19 y 66 años).

Se analizaron las posibles diferencias entre los niveles de cada factor individual, así como las correspondientes combinaciones de los mismos (interacciones) realizándose el análisis de la tabla del ANOVA desde las interacciones de más nivel hasta los efectos individuales de cada factor, y en caso de significación, se realizaron las correspondientes comparaciones múltiples con la penalización de Bonferroni.

Resultados

Los participantes de ambos grupos de edad detectaron la gran mayoría de los estímulos presentados. El porcentaje de estímulos no detectados (errores) en la prueba control fue del 1,11% y del 3,05% en los grupos de jóvenes y mayores, respectivamente. En ambos grupos de edad el porcentaje de respuestas anuladas por defectos de fijación no superó el 2 % de las emitidas. Estos datos, muestran un gran nivel de detección de estímulos y una realización correcta de la prueba por ambos grupos de edad.

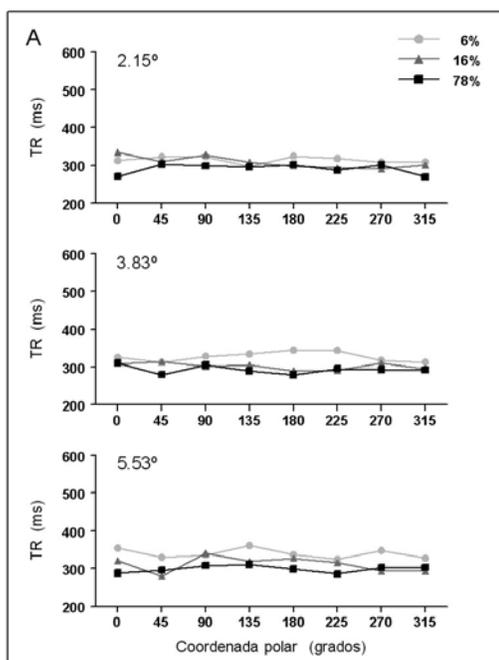


Figura 3. Efectos de la excentricidad y del contraste de los estímulos en relación con las 8 coordenadas polares en ambos grupos de edad: A) jóvenes; B) mayores. Cada punto representa la media de los tiempos de respuesta (TR) obtenidos en cada coordenada. El error estándar de la media no se ha representado por razones de claridad de la figura.

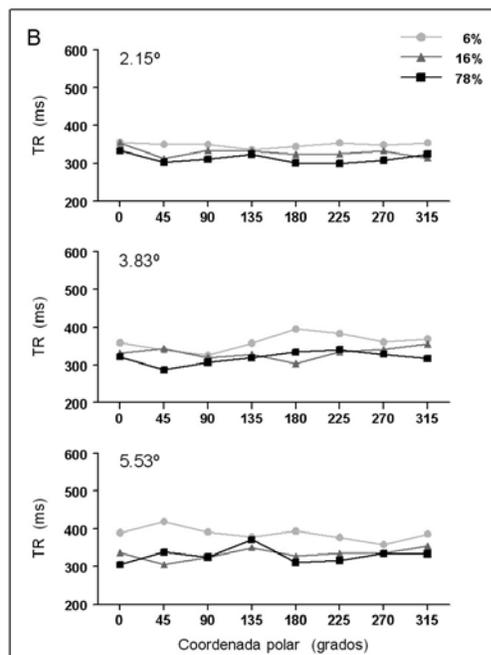


Figura 4. Incremento de los tiempos de respuesta (TR) obtenido por el grupo de mayores en comparación con los jóvenes, en los distintos estímulos presentados. * $p = 0.005$.

En relación con la prueba de atención encubierta, los dos grupos de edad disminuyeron los TR en prácticamente todos los estímulos presentados cuando se

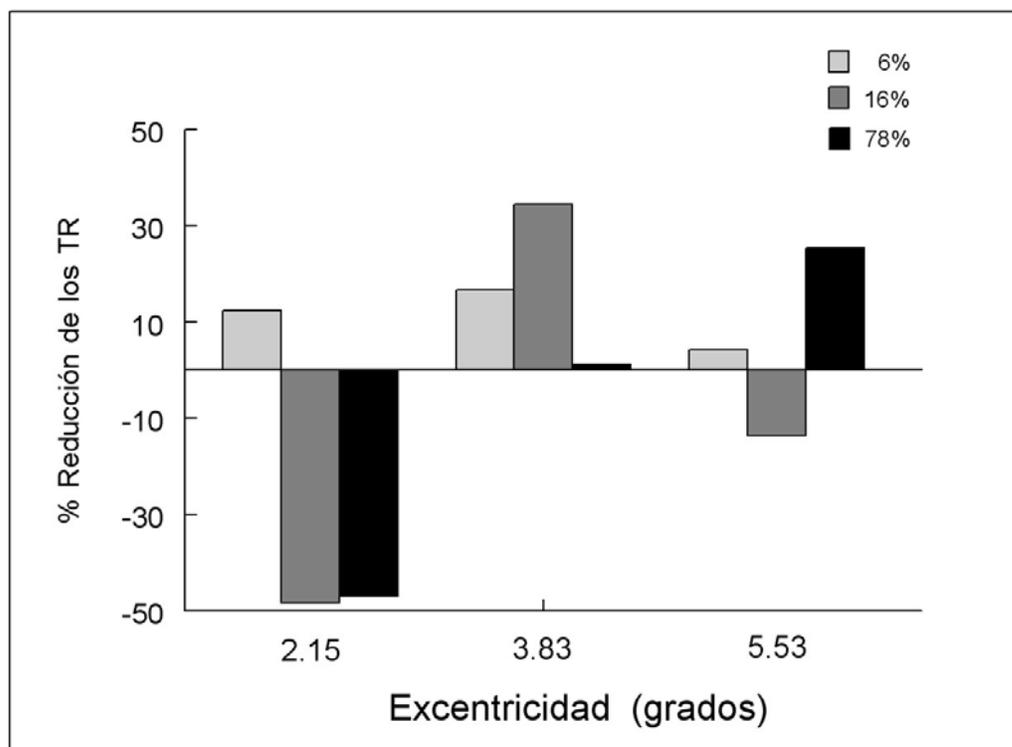


Figura 5. Comparación proporcional de la reducción de los TR obtenidos mediante atención encubierta en ambos grupos de edad, según el contraste y excentricidad de los estímulos. Las barras positivas representan el porcentaje en que el grupo de mayores reduce más que los jóvenes los tiempos de respuesta (TR). Las barras negativas indican el porcentaje en que el grupo de jóvenes reduce más que los mayores los TR.

compararon con los obtenidos en la prueba control precedente. En el grupo de jóvenes, esta reducción de los TR fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$) para los estímulos del 78% de contraste y 2.15° de excentricidad (28 ms menos), 6% y 3.83° (17 ms menos), y 16% y 5.53° (29 ms menos). En el grupo de mayor edad, la reducción de los TR fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$) para los estímulos del 6% y 3.83° (39 ms menos), y 78% y 5.53° (31 ms menos). En comparación con los jóvenes (Fig. 5), el grupo de mayor edad mostró reducciones superiores de los TR en los estímulos presentados en las dos excentricidades mayores (3.83° y 5.53°). En cambio, los jóvenes mejoraron más que los mayores los TR en los estímulos presentados en la excentricidad menor (2.15°). Los TR de la prueba de detección control post-atención fueron similares a los obtenidos en la prueba control precedente.

Discusión

Los resultados muestran que el patrón de detección de estímulos visuales, que varían en contraste y situación en el campo visual, es similar en personas con visión normal dentro del amplio rango de edad estudiado (19-73 años). En ambos grupos de edad, los TR se incrementaron conforme disminuyó el contraste y aumentó la excentricidad de los mismos.

De acuerdo con un estudio reciente [1], los resultados muestran que el contraste y la excentricidad son los dos factores que más influyen en el tiempo que se tarda en la detección de los estímulos presentados en la retina central, y esto ocurre independientemente de la edad de los participantes estudiados. El incremento de los TR conforme aumenta la excentricidad de los estímulos se debe fundamentalmente a que la agudeza visual disminuye progresivamente desde el centro de la fovea debido al descenso de la densidad de conos y de células ganglionares retinianas y del factor de magnificación cortical [11].

En comparación con los participantes de menor edad, el grupo de personas mayores mostraron TR superiores en todos los estímulos presentados. Esto puede deberse a una peor ejecución de la prueba debido un procesamiento neural más lento relacionado con la edad [12,13] y a la naturaleza de la misma (utilización de un mando de consola similar a la de los videojuegos, a la que sin duda están más habituados las personas jóvenes). No obstante y dado que el aumento de los TR no fue homogéneo sino que fue mayor con los estímulos de bajo contraste, una menor capacidad perceptiva visual de las personas mayores a estos estímulos puede también influir en el aumento de los TR de estos estímulos. Como se muestra en la figura 4, los TR de los estímulos de medio (16%) y alto contraste (78%) mostraron un retraso medio de 25 ms, mientras que para los de bajo contraste este retraso fue de 38 ms. En este sentido, se podría estimar en un 8% el incremento de los TR debido a la peor ejecución de la prueba y en un 4% el debido a un déficit de percepción en los estímulos de bajo contraste. Esto último concuerda con el hecho de que la mayoría de los errores (estímulos no detectados) fueron cometidos por el grupo de mayores en los estímulos de bajo contraste. Así, el grupo de jóvenes mostró 4 errores en los estímulos de alto contraste, 4 en los de medio y 8 en los de bajo contraste, mientras que los errores en estos contrastes cometidos por el grupo de mayores fueron 2, 3 y 25, respectivamente. De estos 25 errores, el 68% (17) correspondieron a los estímulos de bajo contraste (6%) presentados en la mayor excentricidad (5.53°). En este sentido, aun cuando ambos grupos mostraron una agudeza visual normal (de al menos 20/20 con los optotipos de Snellen), nuestros datos sugieren que el grupo de mayores detecta con más dificultad los estímulos de bajo contraste.

La atención encubierta a los estímulos produjo un descenso significativo de los TR, respecto de la prueba control de detección, en ambos grupos de edad. Este descenso no se debe a una mejor ejecución de la prueba debido a un factor de aprendizaje, ya que los TR de la prueba de detección realizada después de la de atención fueron similares a los de la prueba control y evidencia que la atención encubierta a los estímulos mejora selectivamente la detección de los mismos. Esto concuerda con estudios previos que muestran que la atención encubierta favorece la percepción visual [3-6,9], e incrementa la actividad de la corteza visual (aumento de la amplitud de los potenciales evocados visuales) debido a la activación de proyecciones eferentes de áreas visuales secundarias dorsales y ventrales a la corteza visual primaria [14,15].

Los resultados muestran, no obstante, que hay diferencias entre ambos grupos de edad en relación con los estímulos que son más favorecidos por la atención encubierta. Así, con la atención, el grupo de menor edad obtuvo beneficios superiores al grupo de mayores en la detección de estímulos presentados en la menor excentricidad. Por el contrario, en el grupo de mayor edad se redujeron proporcionalmente más los TR a los estímulos presentados en las dos excentricidades mayores.

La mayoría de los estudios sobre deterioro cognitivo y edad sitúan en los 60 años el inicio del declive de las capacidades cognitivas en humanos [13]. Así, se ha mostrado que a partir de esta edad la capacidad de memorizar datos en pruebas de evocación retrasada disminuye un 25% [10]. Aun cuando se observa una gran variabilidad individual, habiendo sujetos de edades superiores a los 60 años que realizan estas pruebas de manera similar a los de 30 años de edad. Por otra parte, el número de sinapsis en la corteza visual primaria humana disminuye aproximadamente un 30% a partir de los 60 años, en comparación con los sujetos de 30 años de edad [16]. Nuestros resultados muestran, de manera consistente, que el grupo con edad media de 66 años tarda más en responder a la presentación de los estímulos, debido posiblemente a un deterioro sensorio-motor relacionado con la edad. En cambio, la atención en este grupo, a pesar de la edad, produce beneficios que en algunos casos son superiores a los mostrados por los jóvenes. Estos resultados reflejan una adaptación de los mecanismos de atención visual con la edad, que tiende a favorecer los estímulos más excéntricos y que son precisamente los que se detectan con mayor dificultad.

Conclusión

A diferencia de otros procesos cognitivos, la atención visual se mantiene con un alto grado de eficiencia en el envejecimiento normal y favorece especialmente la detección de estímulos presentados en excentricidades superiores a los dos grados de ángulo visual.

Agradecimientos

Estudio financiado con el apoyo económico de la Junta de Andalucía al grupo BIO-195, del proyecto PB98-1311 y con fondos FEDER.

Referencias

1. Mancebo-Azor R, Sáez-Moreno, JA, Domínguez-Hidalgo I., Luna-Del Castillo, JD, Rodríguez-Ferrer JM. **Efectos del contraste, excentricidad y posición en la detección de estímulos visuales en humanos.** *Rev Neurol* 2009, 48: 129-133.
2. Posner MI, Petersen SE. **The attention system of the human brain.** *Annu Rev Neurosci* 1990, 13: 25-42.
3. Carrasco M, Ling S, Read S. **Attention alters appearance.** *Nature Neurosci* 2004, 7: 308-313.
4. Ling S, Carrasco M. **Sustained and transient covert attention enhance the signal via different contrast response functions.** *Vision Res* 2006, 46: 1210-1220.
5. Liquiang H, Dobkins KR. **Attentional effects on contrast discrimination in humans: evidence for both contrast gain and response gain.** *Vision Res* 2005, 45: 1201-1212.
6. Morrone MC, Denti V, Spinelli D. **Different attentional resources modulate the gain mechanisms for color and luminance contrast.** *Vision Res* 2004, 44: 1389-1401.
7. Hopf JM, Boelmans K, Schoenfeld AM, Heinze, HJ, Luck SJ. **How does attention attenuate target-distractor interference in vision? Evidence from magnetoencephalographic recordings.** *Cogn Brain Res* 2002, 15: 17-29.
8. Colby, CL, Duhamel JR, Goldberg ME. **Visual, presaccadic and cognitive activation of single neurons in monkey lateral intraparietal area.** *J Neurophysiol* 1996, 76: 2841-2852
9. Buracas GT, Boynton GM. **The effects of spatial attention on contrast response functions in human visual cortex.** *J Neurosci* 2007, 27: 93-97.
10. Rapp PR, Bachevalier J. **Cognitive development and Aging.** In Squire LR, ed. *Fundamental Neuroscience.* London: Academic Press; 2003. p. 1167-1200.
11. Rovamo J, Makela P, Whitaker D. **Models of the visual cortex on basis of psychophysical observations.** In Gulyas B, ed. *Functional organization of the human visual cortex.* Oxford: Pergamon; 1993. p. 241-254.
12. Birren JE, Fisher LM. **Aging and speed of behaviour: possible consequences for psychological functioning.** *Ann Rev Psychol* 1995, 46: 329-353.
13. Stuart-Hamilton IA. **Envejecimiento cognitivo normal.** En Tallis RC, ed. *Geriatría.* Madrid: Marban; 2007. p. 125-142.
14. Hillyard SA, Anllo-Vento L. **Event-related brain potentials in the study of visual selective attention.** *Proc Natl Acad Sci* 1998, 95: 781-787.
15. Noesselt T, Hillyard SA, Woldorff MG, Schoenfeld A, Hagner T, Hinrichs H, Heinze H. **Delayed striate cortical activation during spatial attention.** *Neuron* 2002, 35: 575-587.
16. Huttenlocher PR, De Courten C. **The development of synapses in striate cortex of man.** *Hum Neurobiol* 1987, 6: 1-9.

CAPITULO 6

***Evaluación neuropsicógica de la enfermedad de Parkinson:
alteraciones específicas de la atención***

***B. Rapela Orta
E.M. Rodríguez Torrecillas
I. Crespo Martín
J.M. Rodríguez Ferrer***

Evaluación neuropsicológica de la enfermedad de Parkinson: alteraciones específicas de la atención

Bárbara Rapela Orta, Eva M. Rodríguez Torrecillas, Iris Crespo Martín, José M.

Rodríguez Ferrer

Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva. Instituto de Neurociencias. Universidad de Granada.

Autor para correspondência:

Bárbara Rapela Orta, Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva, Instituto de Neurociencia. Telf.: 958 241575

Dirección de correo electrónico.

BRO: barbara_msa13@hotmail.com

Resumen

Introducción. Los trastornos cognitivos relacionados con la enfermedad de Parkinson (EP) se manifiestan en una diversa sintomatología y se han asociado a la disfunción de circuitos córtico-subcorticales. Esta disfunción también se ha relacionado con alteraciones en funciones superiores, como la atención. **Objetivo.** Evaluar diferentes mecanismos de la atención debido a que las estructuras implicadas en esta función están relacionadas con estructuras subcorticales como los ganglios basales y la sustancia negra, deterioradas en esta enfermedad. **Métodos.** Se estudiaron 28 sujetos, 14 con EP sin demencia y 14 controles sanos. Se les administró pruebas neuropsicológicas como Test Stroop, Visual Search and Attention Test, Búsqueda de Símbolos (WAIS III), Five Digits y Trail Making Test, todas ellas encargadas de evaluar diferentes tipos de la atención como son, la atención selectiva, serial, dividida y ejecutiva. **Resultados.** Los pacientes con EP tuvieron un rendimiento cognitivo inferior al del grupo control. Ambos grupos mostraron diferencias significativas en todas las áreas atencionales evaluadas. **Conclusión.** Los mecanismos atencionales más deteriorados en estos pacientes son la atención selectiva y la atención ejecutiva ya que son incapaces de inhibir la información irrelevante y de flexibilizar sus respuestas. Aunque las bases fisiopatológicas de los trastornos cognitivos en la EP son todavía inexactas, los resultados hallados en este estudio son congruentes con otros en los que han relacionado estos déficits en la atención con la alteración de los circuitos frontoestriados. Debido a que los síntomas frontales son los más destacables, se ve la necesidad de dedicar futuras investigaciones a esta área cerebral.

Palabras Clave. Enfermedad de Parkinson. Circuitos córtico-subcorticales. Atención selectiva, serial, dividida y ejecutiva.

Introducción

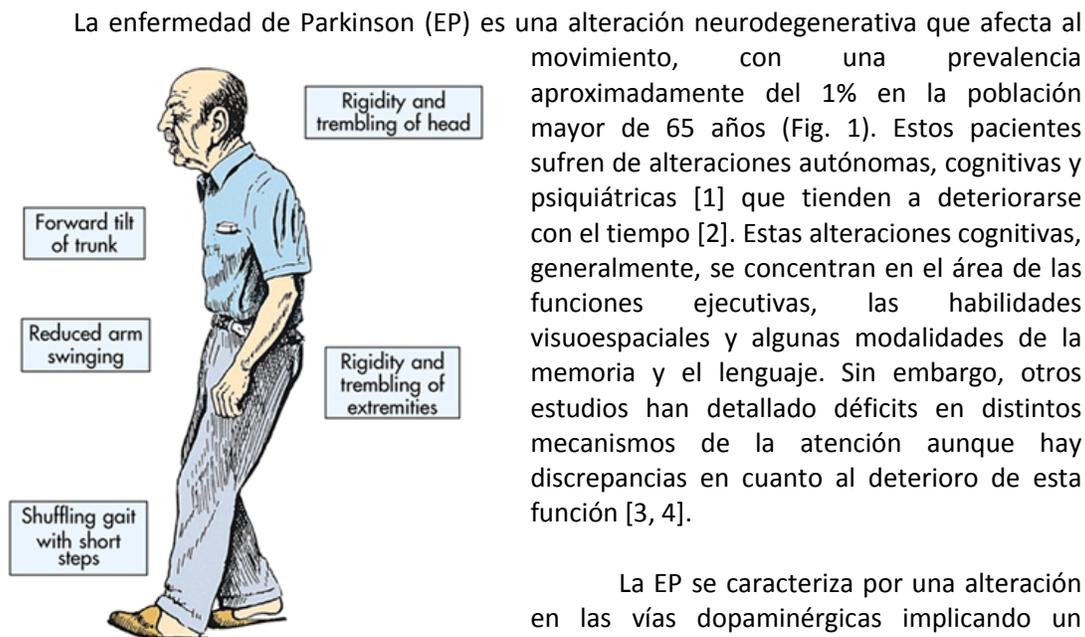


Figura 1. La enfermedad de Parkinson se caracteriza por presentar una serie de síntomas cardinales como bradicinesia, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural.

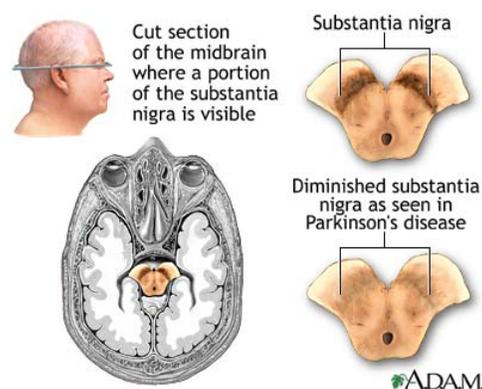


Figura 2. Hay hallazgos que demuestran que en la EP existe pérdida neuronal y de pigmentación en la sustancia negra y en otros núcleos subcorticales pigmentados. Los cambios producidos en la sustancia negra se relacionan paralelamente con la reducción de dopamina en el estriado y, además, dado que la zona compacta de la sustancia negra es la que contiene mayor proporción de cuerpos dopaminérgicos del cerebro, estos hallazgos sugieren que la vía dopaminérgica nigroestriatal está lesionada en los pacientes con EP.

actos motores también ofrecen evidencias de la “frontalidad” de los síntomas [5]. Otras

evidencias que se aprecian son: dificultad en la inhibición de estímulos periféricos, alteraciones en el cambio de clave estimular, tendencia a las alteraciones atencionales concretas y dificultad en el mantenimiento atencional [12].

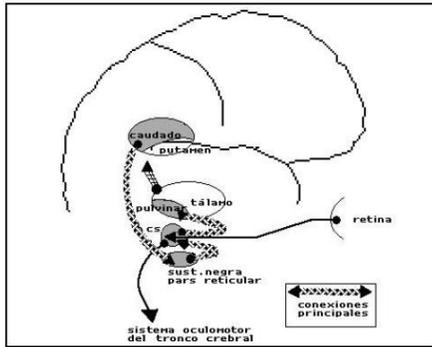


Figura 3. Las conexiones del caudado a la sustancia negra, de ésta al colículo superior y de éste al tálamo conforman el circuito básico subcortical de la atención.

La atención es otra de las funciones frontales deteriorada en los pacientes con EP que implica varios procesos perceptivos, de concentración, etc., indispensables para poner en marcha la atención. Atender no sólo consiste en focalizar selectivamente nuestra consciencia sino también en filtrar y desechar la información no deseada. Debido a la complejidad conceptual, neuroanatómica y neurofuncional de la atención, es imposible reducir el término a una definición, así como también lo es ligarla a una sola estructura anatómica o evaluarla con un único test.

Implícitamente se reconocen varios tipos clínicos de atención. Ésta puede ser subdividida en nueve tipos de aplicaciones clínicas que pueden ser evaluados con diferentes test y pruebas neuropsicológicas [13]. Éstos serían: “arousal”, “span”, “atención selectiva”, “atención de desplazamiento”, “atención serial”, “atención dividida”, “atención de preparación”, “atención sostenida” e “inhibición”.

Ante la falta de investigaciones dedicadas a estudiar los mecanismos específicos de la atención en pacientes con EP y los datos contradictorios encontrados en cuanto a esta función relacionados con la EP, se planteó la necesidad de explorar en profundidad diferentes tipos de la atención: atención dividida, serial, selectiva y atención ejecutiva. Además, debido a la alteración en las estructuras anatómicas implicadas en la atención, se trazó como objetivo detectar déficits específicos en esta función en pacientes con EP y se predijo que su rendimiento cognitivo debería ser inferior comparándolos con sujetos controles sanos.

Resultados

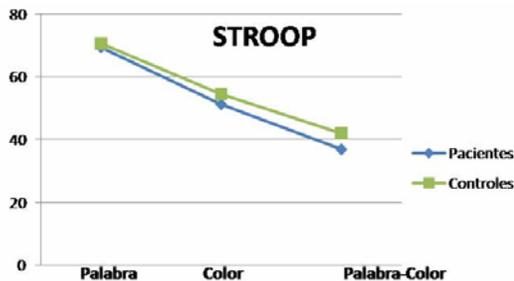


Figura 4. Puntuaciones medias de ambos grupos en el Test Stroop. Los resultados en este test muestran el número de palabras que nombraron en un tiempo de 45 s. Se encontraron diferencias que se acercan a la significación entre ambos grupos en la condición palabra-color.

En el *Test Stroop*, pacientes y controles no se diferenciaron en su ejecución. Sin embargo, se hallan pequeñas diferencias en la prueba de interferencia que se acercan a la significación, $p < 0,05$ (Fig. 4).

En la prueba *Búsqueda de Símbolos* de WAIS III se hallan diferencias significativas entre ambos grupos con una significación de $p = 0,008$. Se evidencia que el grupo control tiene puntuaciones más altas que los pacientes con EP (Fig. 5).

Se encontraron diferencias significativas ($p = 0,016$) en *Trail Making Test*. Los pacientes con EP rindieron peor que los



Figura 5. Puntuaciones medias de los aciertos de ambos grupos en la prueba Búsqueda de Símbolos. Se hallan diferencias significativas entre ambos grupos $*p= 0,008$. Los pacientes con EP tienen una ejecución muy por debajo que la del grupo control.



Figura 6. Puntuaciones medias de los TR que los sujetos emplearon en completar TMT A y B. Se encontraron diferencias significativas ($*p = 0,016$).

controles. Su ejecución en TMT-B fue inferior, no obstante el tiempo de reacción de los controles aumentó en comparación con el grupo de los pacientes debido al tiempo empleado en realizar correctamente la parte B de la prueba (Fig. 6).

Por otro lado, se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos en varias subpruebas del test *Five Digits*. Exceptuando Elección e Inhibición de Respuesta, las demás condiciones del test, es decir, Lectura ($p = 0.013$), Conteo ($p = 0.05$), Alternancia ($p = 0.011$) y Flexibilidad de Respuesta ($p = 0.018$), mostraron diferencias significativas entre pacientes y controles (Fig. 7).

En *Visual Search and Attention Test* (VSAT) se encontraron diferencias significativas ($p = 0,009$) en cuanto a los aciertos, entre pacientes y controles, de forma global. Se empleó la prueba estadística Bonferroni para la comparación por pares de ambos grupos en cada una de las subpruebas en que se divide el test. Se hallaron diferencias significativas en tres de los cuatro subtest, $p < 0,05$, exceptuando la subprueba "H", la cual se acercó **bastante a la significación** ($p = 0,066$) (Fig. 8A). En referencia a los errores, se encontraron diferencias

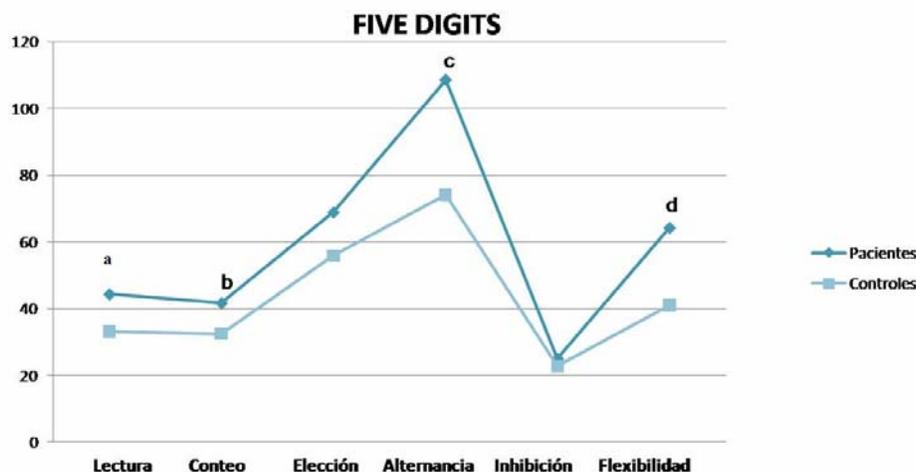


Figura 7. Media del tiempo empleado en terminar Five Digits. Se hallaron diferencias significativas en: Lectura ($^a p = 0,013$), Conteo ($^b p = 0,05$), Alternancia ($^c p = 0,011$) y Flexibilidad ($^d p = 0,018$).

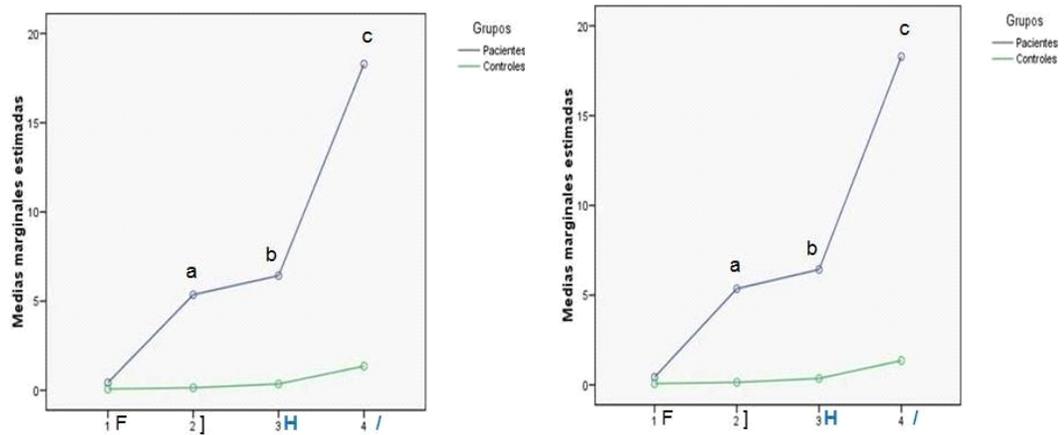


Figura 8. Resultados de los aciertos y errores obtenidos en Visual Search and Attention Test. A) Media de los aciertos obtenidos en V-SAT. Se hallaron diferencias significativas $p = 0,009$ entre los grupos. Se encontraron diferencias significativas en las pruebas: 1 F ($p = 0,022$), 2] ($p = 0,025$), 4 / ($p = 0,040$). **B)** Media de los errores en V-SAT. Los resultados mostraron diferencias altamente significativas $p = 0,001$. Las pruebas obtuvieron una significación de: 2] ($p = 0,025$), 3 H ($p = 0,007$), 4 / ($p = 0,001$).

altamente significativas entre los grupos estudiados, $p = 0,001$. También, se hallaron diferencias en la ejecución de los sujetos en las comparaciones en tres de las cuatro pruebas del test. No obstante, la prueba que más diferencias significativas obtuvo en comparación con las demás fue la prueba “/” en la que se combina la búsqueda de la forma del estímulo con el color. El rendimiento de los sujetos, en cuanto a errores se refiere, en la primera prueba (F) fue muy similar, ya que prácticamente no cometieron errores. Los sujetos controles tuvieron

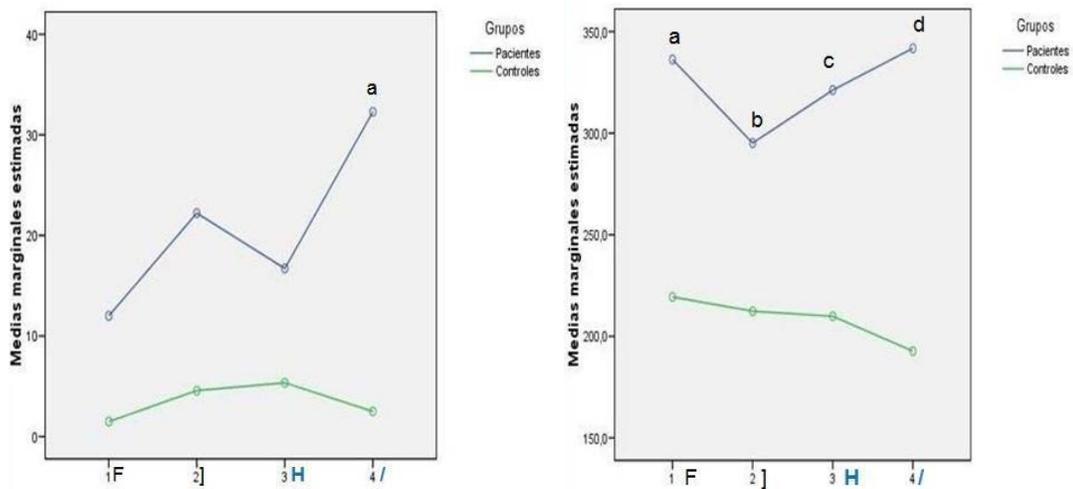


Figura 9. Resultados de las omisiones y el tiempo obtenidos en Visual Search and Attention Test. A) Media de omisiones cometidas en V-SAT. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos, de manera global, $p = 0,001$. La prueba / fue la única estadísticamente significativa $p = 0,001$. **B)** Media del tiempo empleado en ejecutar las subpruebas. Se hallaron diferencias significativas entre los grupos $p = 0,002$. Las pruebas obtuvieron una significación de: 1 F ($p = 0,016$), 2] ($p = 0,035$), 3 H ($p = 0,006$), 4 / ($p = 0,007$).

un patrón de respuesta similar en todas las pruebas del test (Fig. 8B).

En cuanto a las omisiones cometidas en VSAT, se encontraron diferencias significativas entre los grupos, de manera global, $p = 0.001$. Sin embargo, en las comparaciones múltiples entre las distintas pruebas que componen el test, no se observan diferencias significativas. Por otra parte, se hallaron diferencias significativas ($p = 0.002$) entre sujetos controles y pacientes con EP, globalmente, en el tiempo que emplearon en completar las pruebas. La subprueba (/) fue la que más diferencias estadísticas encontró en comparación con los controles (Fig. 9).

Discusión

En el presente estudio se planteó la necesidad de evaluar y estudiar diferentes componentes de la atención en pacientes, sin demencia, con enfermedad de Parkinson. Para ello, se utilizaron diferentes test neuropsicológicos para valorar esta función cerebral en dichos pacientes.

Dada la variedad de manifestaciones atencionales, Posner defiende que está producida por sistemas atencionales separados compuestos por redes atencionales diferenciales: La Red Atencional Anterior, la Red Atencional Posterior y la Red Atencional de Vigilancia y/o Alerta [14].

Se considera que existe una estrecha relación entre esta La Red Atencional Anterior y los procesos de detección consciente de estímulos y con procesos de memoria de trabajo [15, 16]. Para evaluar el grado de deterioro que tienen los pacientes con déficits atencionales en esta red, una forma muy utilizada ha sido la tarea tipo Stroop y, en menor medida, el test Five Digits, ya que presentan conflicto estimular y/o de respuesta. Para ejecutar correctamente la tarea, es necesario seleccionar activamente la parte relevante de esa información para que el cerebro pueda producir respuestas eficaces. Se deduce que el cerebro necesita poseer un sistema de atención selectiva que debe reunir dos propiedades principales: Permanencia o mantenimiento potente de la actividad cortical relacionada con los estímulos que demandan una tarea relevante; y actualización rápida y selectiva [17]. Estas dos características son esenciales para ejecutar tareas como el Visual Search and Attention Test (V-SAT). Este tipo de tarea pertenece a las llamadas tareas de cancelación, muy utilizadas para evaluar la atención en pacientes con EP ya que requieren muchas de las operaciones que se cree están deterioradas en esta enfermedad.

La Red Atencional Posterior está relacionada con la orientación viso-espacial de la atención, por lo que también se le ha llamado red de orientación [15]. La orientación es distinta de la detección, la detección implica consciencia del estímulo. Esta distinción es fundamental, pues algunas respuestas pueden estar disponibles antes de que el estímulo haya sido detectado (por ejemplo, los movimientos oculares sacádicos) [18].

Los resultados obtenidos muestran que existen diferencias significativas entre los sujetos controles y los pacientes con EP en los cuatro tipos de atención que se evaluaron. Concretamente, uno de los mecanismos más alterados en estos pacientes es la atención dividida, es decir, cuando los sujetos tienen que procesar dos o más tareas en paralelo. Es el caso de las dos últimas condiciones del VSAT y la parte B de Trail Making. En ambas pruebas el rendimiento de los pacientes fue claramente inferior al de los controles sanos.

En este sentido, Filoteo et al. [19] encontraron resultados similares en la prueba VSAT, esto es, pacientes y controles diferían significativamente tanto en el tiempo empleado en

finalizar las pruebas como en los errores de omisión cometidos. En los pacientes de nuestro estudio también se encontró este patrón de respuesta, de la misma manera que cometían más errores de omisión cuando el objetivo era un símbolo y, también, cuando su búsqueda se basaba en forma y color, es decir, en el ensayo tres y cuatro. Por el contrario, los controles no diferían en su patrón de ejecución y, por lo tanto, no se aprecia alteración en su atención dividida y selectiva. Como muestran las gráficas 8 A y B y 9 B los pacientes aciertan menos, cometen más errores y omisiones en las tareas en las que el objetivo es un símbolo, en comparación con los sujetos controles. Además, por su parte, los controles tienden a cometer más errores y menos aciertos en esta última condición de la prueba, en comparación con su ejecución en las demás tareas. Estos hallazgos también se encontraron en el citado estudio, en el que ambos grupos cometían más errores en la búsqueda de dos características del estímulo objetivo, cuando se trataba de símbolos. Estos autores concluían que, en relación con los sujetos controles, los pacientes con EP sin demencia mostraban deterioro diferencial en VSAT en términos de tiempo de realización y errores de omisión, mientras que no demostraron una ejecución anormal en términos de errores. Sin embargo, en este estudio se encontraron diferencias significativas tanto en aciertos, omisiones, tiempo y errores entre ambos grupos.

En esta misma línea, Sánchez-Rodríguez [20] encontró diferencias significativas en Trail Making Test comparando pacientes con EP y controles. Este autor realizó una evaluación neuropsicológica completa a estos sujetos. Los resultados de su estudio, en cuanto a la valoración de la atención, mostraron diferencias significativas en la segunda y tercera lámina del test de Stroop de colores y palabras; los sujetos diagnosticados de EP fueron los que obtuvieron una menor puntuación. Asimismo, en nuestra investigación se encontraron resultados similares en referencia al test de Stroop, es decir, aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas, las medias halladas de cada lámina en ambos grupos son muy similares a los resultados encontrados por Sánchez-Rodríguez [20].

Debido a las diferencias encontradas tanto en VSAT, Test de Stroop y Búsqueda de Símbolos, se puede concluir que los pacientes con EP presentan alteraciones en la atención selectiva, en comparación con sujetos normales. Estos hallazgos están en contraposición con otros [4] en los se encuentra que los pacientes con EP tienen conservadas tanto la atención selectiva como la atención dividida.

En el subtest Búsqueda de Símbolos de la batería neuropsicológica de Wechsler se encontraron diferencias significativas en ambos grupos de sujetos. Además, según los baremos estandarizados de esta prueba, el rendimiento de los pacientes con EP estuvo por debajo de la media en comparación con la población general, no así la ejecución de los controles.

En cuanto a la exploración de la atención ejecutiva o inhibición de nuestros pacientes, los resultados nos revelan alteraciones significativas. Se han encontrado déficits en la inhibición en pruebas que evalúan esta función como TMT-B, Test de Stroop y Five Digits. En ésta última, se encontraron diferencias significativas en flexibilidad mental, es decir, los pacientes carecen de esta habilidad para cambiar de criterio cuando las circunstancias lo requieren, concretamente, en la lámina de Alternancia de dicha prueba. En cuanto a la inhibición, en Five Digits, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Esto puede ser debido a que en la subprueba Elección los dos grupos emplearon más tiempo en completar la prueba ya que se necesitan más recursos cognitivos para realizarla correctamente. Asimismo, la ausencia de diferencias significativas en cuanto a inhibición puede deberse a que con la edad las funciones ejecutivas se van deteriorando. No obstante, los pacientes con EP muestran un deterioro significativo en atención ejecutiva y en la

atención en general, como lo demuestran los resultados obtenidos en TMT, la incapacidad para atender selectivamente a los estímulos propuestos en la tarea Stroop y la pobre ejecución en la prueba de Alternancia de Five Digits. Por lo tanto, nuestros pacientes han presentado alteraciones en la habilidad para procesar la información de una forma congruente a la demanda de la tarea y de una forma flexible. Esta misma dificultad se ha encontrado a la hora de cambiar de set durante la ejecución de la segunda parte del TMT. Estas alteraciones ejecutivas provocan que los pacientes obtengan peores resultados en tareas que requieren un esfuerzo cognitivo elevado y un control de la inhibición de estímulos, estos hallazgos son congruentes con los encontrados por otros autores [21].

Por último, la atención serial, evaluada comúnmente por tareas de cancelación como Visual Search and Attention Test, muestra déficits derivados de las diferencias significativas halladas en los resultados de pacientes con EP y controles. Ambos grupos cometen errores y omisiones, sin embargo, la ejecución y el rendimiento cognitivo de los pacientes, en este estudio, fue inferior al de los sujetos controles sanos.

Existen estudios que apoyan la teoría de que los déficits cognitivos de los pacientes con EP se deben a la desconexión de las vías frontales. Uno de ellos es el de Taylor et al [22] en el que utilizando el Wisconsin Card Sorting Test encontraron diferencias significativas entre los números de categorías, hallaron un predominio de respuestas perseverativas así como un mayor número de errores para llegar a la primera categoría, lo que implica menor habilidad para llevar a cabo un plan de acción ante una tarea.

Una cuestión metodológica importante es que las diferencias en los resultados obtenidos en nuestra muestra de pacientes se ven afectadas por la discapacidad motora que presentan. En este sentido, es importante señalar que aunque ambos grupos diferían en el tiempo de realización de las pruebas, tales diferencias no fueron extremas. Por lo tanto, no se considera esta variable como la causante de las diferencias halladas en ambos grupos.

Conclusiones

Se puede afirmar, de manera general, que los pacientes con EP tienen un rendimiento muy inferior en tareas de atención en comparación a sujetos controles sanos. Fundamentalmente, estas diferencias se evidencian en tareas de atención selectiva, una de las más afectadas en esta enfermedad, como son las pruebas de cancelación y búsqueda visual así como en tareas de atención ejecutiva, ya que es otro de los grandes mecanismos perturbados por esta enfermedad. Estos resultados demuestran que la red atencional más afectada por la enfermedad de Parkinson es la red atencional anterior.

Aunque las bases fisiopatológicas de los trastornos cognitivos en la EP son controvertidas y todavía inexactas, los resultados hallados en este estudio son congruentes con otros [9, 23, 24] en los que han relacionado estos déficits en la atención ejecutiva con la alteración de los circuitos frontoestriados que conectan los ganglios basales con la corteza prefrontal dorsolateral. Como se dijo anteriormente, las estructuras neuroanatómicas afectadas por la enfermedad de Parkinson coinciden en gran medida con las estructuras subcorticales implicadas en la atención. Estos hallazgos sugieren que la sintomatología presentada por estos pacientes se debe, en gran medida, a una disfunción frontal. En futuros estudios, nos centraremos en esta área cerebral además de realizar una comparación exhaustiva de las estructuras neuroanatómicas implicadas en la EP así como en la atención. Asimismo, se debería de aumentar la muestra de pacientes y controles para poder generalizar los resultados.

Métodos

Sujetos. Un total de 28 sujetos (14 pacientes diagnosticados de Parkinson y 14 controles neurológicamente sanos) participaron en el estudio con una media de edad de $69,86 \pm 9,59$ años para los pacientes y de $72,93 \pm 7,99$ para los controles. Los pacientes fueron reclutados de la Asociación de Parkinson de Granada, la Clínica Neurológica Neurodem de Almería, la Residencia de Ancianos Asistida de la Diputación de Almería y el Centro Asistencial “La Gota de Leche” de Melilla. Según los niveles establecidos por Hohen y Yhar, todos los pacientes presentaban un grado de afectación leve-moderado (estadio 2-3). La duración de la enfermedad oscilaba entre los 2 y los 32 años. Los pacientes con enfermedad de Parkinson se estaban tratando con algún tipo de medicamento antiparkinsoniano (levodopa y agonistas dopaminérgicos) en el momento de la prueba. Los criterios de exclusión fueron presencia de enfermedades psiquiátricas graves, accidente cerebrovascular o etapas avanzadas de la enfermedad. También se excluyeron aquellos sujetos que no sabían leer y tenían visión deteriorada. Algunos de los acompañantes de los pacientes se ofrecieron como sujetos control y otros fueron reclutados del Centro Social de Membrilla, Ciudad Real.

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes en el estudio.

Materiales y procedimiento. Fueron evaluados cuatro mecanismos atencionales: atención serial, atención selectiva, atención dividida y atención ejecutiva o inhibición. Para evaluar la atención serial se emplearon las cuatro condiciones del V-SAT, la atención selectiva se valoró utilizando V-SAT, Búsqueda de Símbolos de la Wechsler Adults Intelligence Scale y Test Stroop. La condición de interferencia del test Stroop, la parte B de Trail Making Test así como Five Digits se emplearon para evaluar la atención ejecutiva y, por último, la atención dividida fue evaluada por las dos últimas condiciones del V-SAT así como la parte B de Trail Making Test. La tabla 1 muestra los diferentes tipos de atención relacionados con los sistemas atencionales de Posner y los paradigmas de exploración clínica.

Tabla 1. Sistemas y tipos de atención.

Tipos de Atención Posterior	Paradigmas de exploración clínica
– Atención selectiva espacial o de localización de estímulos	– Tareas de búsqueda visual y de cancelación
– Atención serial	– Tareas de cancelación
Tipos de Atención Anterior	Paradigmas de exploración clínica
Atención dividida o dual o compartida	Tapping con interferencia
Inhibición	Paradigma Stroop
Atención selectiva a propiedades del objeto	Pruebas de búsqueda visual

El *Test Stroop* evalúa la capacidad de cambio de una estrategia inhibiendo la respuesta habitual y ofreciendo una nueva respuesta ante nuevas exigencias estímulares. Consta de tres condiciones, la primera consiste en leer palabras (verde-rojo-azul), en la segunda parte hay que nombrar el color en el que están impresas no-palabras, y por último, la tarea en la última lámina consiste en inhibir la lectura y nombrar el color en el que está impresa la palabra. Todas ellas tienen un tiempo límite de 45 s. Los resultados obtenidos en

sucesivos estudios han demostrado que la latencia de respuesta del sujeto cuando la palabra es incompatible con el color de la tinta aumenta significativamente con relación a cuando la palabra es congruente o neutra [25].

Por su parte, la tarea en *Búsqueda de Símbolos* es señalar, si aparece o no, dos estímulos objetivo de entre varios estímulos de prueba en un tiempo de 120 s. El *Trail Making Test* es una prueba que se divide en dos partes, la primera consiste en unir números del 1 al 25 y la segunda parte se añaden letras para combinarlas entre sí de manera que se alternen números y letras hasta llegar del 1-A al 13. El *V-SAT* (Visual Search and Attention Test) contiene cuatro láminas con un estímulo objetivo el cual hay que tachar de una serie de estímulos de las mismas características. Tiene dos condiciones, la primera (láminas 1 y 2) se basa en una búsqueda simple (solo la forma) y la segunda (dos últimas láminas) en una búsqueda doble (color y forma).

Por último, *Five Digits* es similar al *Test Stroop*, sin embargo añade una condición más. Las tres primeras son iguales que en el citado test pero sus estímulos son números del uno al cinco, es decir, en la primera condición hay que leer el número, en la segunda contar símbolos y en la tercera inhibir la lectura y contar los números. En la última condición de *Five Digits* hay que combinar la inhibición del conteo con la lectura de los números, según estén remarcados los estímulos o no.

Las pruebas fueron administradas siguiendo el mismo orden y de manera estandarizada, exceptuando el *V-SAT* en el cual a los sujetos se les permitió completar las láminas de cada ensayo, en lugar de dentro de un límite de 60 s. Las investigadoras registraron el tiempo en completar las pruebas con un cronómetro. El tiempo comenzaba cuando las experimentadoras lo indicaban y concluía cuando el sujeto tachaba el último ítem de la prueba o el tiempo de ejecución terminaba.

La administración del conjunto de pruebas neuropsicológicas tenía una duración aproximada de 45 min. No obstante, el tiempo de los sujetos controles era más reducido a la hora de completar la batería de test.

Análisis de datos. Se realizaron análisis de comparaciones de medias para estudiar las diferencias entre los grupos, así como análisis mediante el modelo lineal general de medidas repetidas, la prueba estadística T de Student, la U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon. Todos los análisis fueron realizados con la versión 15.0 para Windows del paquete estadístico SPSS.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Dra. María Teresa Miranda León su ayuda con el análisis estadístico de los resultados, así como al Dr. Miguel Pérez García por proporcionar algunas de las pruebas utilizadas. También agradecer a la Asociación de Parkinson de Granada, la Clínica Neurodem de Almería, La Residencia Asistida de Ancianos de la Diputación de Almería, el Centro Asistencial y Social de Melilla y Ciudad Real, así como a los participantes, por colaborar en esta investigación.

Referencias

1. Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. **Molecular pathophysiology of Parkinson's disease.** Annual Review of Neuroscience 2005; 28: 57-87.
2. Muslimovic D, Post B, Speelman JD, De Haan RJ. **Cognitive decline in Parkinson's disease: A prospective longitudinal study.** Journal of the International Neuropsychological Society 2009; 15: 426-437.
3. Alonso-Prieto E, Esteban EM, Trujillo-Matienzo C, Lara-Fernández GE, Roussó-Viota T, Cordero-Eiriz A. **Alteraciones específicas de la atención en estadios tempranos de la enfermedad de Parkinson.** Rev Neurol 2003; 36: 1015-8.
4. García-Ogueta MI. **Mecanismos atencionales y síndromes neuropsico-lógicos.** Rev Neurol 2001; 32: 463-7.
5. Otrosky-Solis F. **Características neuro-psicológicas de la enfermedad de Parkinson.** Rev Neurol 2000; 30: 788-96.
6. Hornykiewicz O, Kirsh S. **Neurochemical basis of dementia in Parkinson's disease.** Can J Neurol Sci 1984; 11: 185-90.
7. Pascual-Leone A, Press D. **Trastornos cognitivos y comportamentales en la enfermedad de Parkinson.** Rev Neurol 1999; 29: 152-7.
8. Estévez-Gonzalez A, García-Sánchez C, Barraquer-Bordas LI. **Los lóbulos frontales: el cerebro ejecutivo.** Rev Neurol 2000; 31: 566-77.
9. Catalá-Barceló J. **Papel de los ganglios basales en la monitorización de las funciones de los lóbulos frontales.** Rev Neurol 2002; 34: 371-7.
10. Bruna O, Roig C, Junqué C, Vendrell P, Grau-Veciana JM. **Relación entre las alteraciones visoespaciales y los parámetros oculomotores en la enfermedad de Parkinson.** Psicothema 2000; 12: 187-191.
11. Vera-Cuesta H, Vera-Acosta H, Álvarez-González L, Fernández-Maderos I, Casabona-Fernández E. **Disfunción Frontal en la enfermedad de Parkinson idiopática.** Rev Neurol 2006; 42: 76-84.
12. Perea-Bartolomé MV. **Deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson.** Rev Neurol 2001; 32: 1182-7.
13. Estévez-González A, García-Sánchez C, Junqué C. **La atención: una compleja función cerebral.** Rev Neurol 1997; 25: 1989-97.
14. Funes MJ, Lupiáñez J. **La teoría atencional de Posner: una tarea para medir las funciones atencionales de Orientación, Alerta y Control Cognitivo y la interacción entre ellas.** Psicothema 2003; 15: 260-266.
15. Posner, M.I. y Dehaene, S. **Attentional networks.** Trends in Neuroscience 1994; 17: 75-79.
16. Posner, M.I. y Petersen, S.E. **The attention system of the human brain.** Annual Review of Neuroscience 1990; 13: 25-42.
17. Miller EK, Cohen JD. **An integrative theory of prefrontal cortex function.** Annu Rev Neurosci 2001; 24: 167-202.
18. Colmenero JM, Catena A, Fuentes LJ. **Atención Visual: Una revisión sobre las redes atencionales del cerebro.** Anales de Psicología 2001; 17: 45-67.
19. Filoteo JV, Williams BJ, Rilling LM, Roberts JW. **Performance of Parkinson's Disease Patients on the Visual Search and Attention Test: Impairment in Single-Feature but not Dual-Feature Visual Search.** Archives of Clinical Neuropsychology 1997; 12: 621-634.
20. Sánchez-Rodríguez JL. **Déficits neuropsicológicos en la enfermedad de Parkinson: Relación con variables clínicas.** Rev Neurol 2002; 35: 310-7.

21. Muñiz-Casado JA, Osuna-Benavides A. **Estudio de las funciones ejecutivas en pacientes con enfermedad de Parkinson en fases iniciales.** Mapfre Medicina 2007; 16: 00-00.
22. Taylor AE, Saint-Cyr JA, Lang AE. **Frontal lobe dysfunction in Parkinson's disease. The cortical focus of neostriatal outflow.** Brain 1986; 109: 845-83.
23. Parrao-Díaz T, Chaná-Cuevas P, Juri-Claverías C, Kunstmann C, Tapia-Núñez J. **Evaluación del deterioro cognitivo en una población de pacientes con enfermedad de Parkinson mediante el test minimental Parkinson.** Rev Neurol 2005; 40: 339-44.
24. Leiva-Santana C, Álvarez-Saúco M. **Levodopa y alteraciones cognitivas en la enfermedad de Parkinson.** Rev Neurol 2006; 43: 95-100.
25. Bausela E, Santos JL. **Utilidad del Stroop en la Psicología Clínica.** Avances en Salud Mental Relacional. 2006; 5: 00-00.

CAPITULO 7

En la atención: ¿Vale una imagen más que mil palabras?

***I. Crespo Martín
B. Rapela Orta
E.M. Rodríguez Torrecillas
R. Mancebo Azor
J.M. Rodríguez Ferrer***

En la atención: ¿Vale una imagen más que mil palabras?

Iris Crespo Martín, Bárbara Rapela Orta, Eva M. Rodríguez Torrecillas, Rafael Mancebo Azor, José M. Rodríguez Ferrer

Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva. Instituto de Neurociencias. Universidad de Granada.

Autor para correspondencia:

Iris Crespo Martín, Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva, Instituto de Neurociencias.

Telf.: 958 241575

Dirección de correo electrónico:

ICM: icm_dafne@hotmail.com

Resumen

Introducción. Las emociones desempeñan un papel importante en la comunicación de intenciones a los demás, pero también pueden desempeñar el papel de guía cognitiva. Afirmación que resulta coherente con el planteamiento de Anderson y Phelps (2001) según el cuál, la señal originada en la amígdala ayuda a incrementar la sensibilidad perceptual de los estímulos. **Objetivo.** Estudiar en que medida influyen las imágenes emotivas en la realización de un ejercicio de atención selectiva. **Métodos.** En 21 voluntarios sanos presentamos una tarea de detección visual rápida (PRSV) en la que una imagen del IAPS, de valencia positiva activante (PA), positiva no activante (PN), negativa activante (NA), negativa no activante (NN) o neutra (NT), era seguida en la mitad de los ensayos por la palabra AGUA, la cuál debía ser detectada por los participantes. **Resultados.** Los datos obtenidos muestran que se produce el efecto conocido como parpadeo atencional y una interacción significativa entre la posición 3 y las imágenes positivas activantes (PA). **Conclusiones.** Los resultados indican un cambio de orientación en la atención que pasa de estar dirigida por una meta (orientación voluntaria), a estar regida por las características del estímulo (orientación involuntaria). Además, sugieren la existencia de discrepancias en la detección de la palabra en función del sexo del individuo, lo cuál pone en evidencia la diferencia de saliencia emocional de los estímulos para hombres y mujeres. Conclusión, el valor emocional de los estímulos influye sobre los límites temporales de la atención, existiendo ventajas de acceso al procesamiento en ciertos estímulos de valencia afectiva y “arousal”.

Palabras clave. Atención. Emoción. Género.

Introducción

Podemos entender la atención como: La habilidad para concentrar la experiencia perceptiva sobre una porción limitada de la información sensorial disponible y así lograr una impresión clara y vivida de la misma. La atención se puede dividir en dos componentes, la matriz y el canal atencional [1]. La matriz atencional o atención tónica, define la capacidad de procesamiento general de la información, el nivel de vigilancia o alerta y la resistencia a la interferencia. Sus propiedades, el estado de alerta y el nivel de vigilancia, le confieren su capacidad de monitorización permanente de los múltiples estímulos entrantes y de la detección de aquellos biológicamente significativos, los cuales generan una respuesta de orientación con cambio del foco atencional.

El paradigma experimental PRSV (Presentación Rápida de Series Visuales) consiste en una serie de estímulos que se suceden rápidamente en un mismo lugar de la pantalla del ordenador a un ritmo de 10 estímulos por segundo. Este tipo de tarea es muy utilizada para el estudio del efecto llamado “parpadeo atencional” o Attentional Blink [2]. Cuando de esta serie, solo se nos pide que detectemos un estímulo concreto normalmente solemos detectarlo con una precisión próxima a la perfección (100% de las veces). Sin embargo, cuando se nos pide que localicemos dos estímulos temporalmente próximos (alrededor de medio segundo) en dicha serie, la detección baja a niveles próximos al azar. Para explicar este fenómeno se expone que la atención necesita ese tiempo para recuperarse, y así estar disponible para otro estímulo [3, 4].

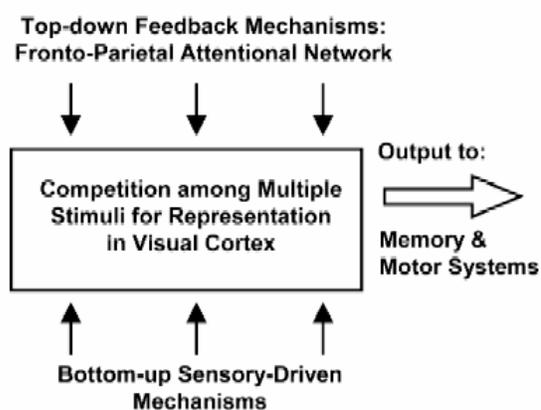


Figura 1. Modelo de Desimone y Duncan (1995). La competición por los recursos atencionales se puede llevar a cabo por diferentes caminos: uno de ellos, es el mecanismo Bottom-up, o conductor sensitivo, generado en el córtex visual, y el otro, es el mecanismo Feedback top-down, que está hipotéticamente relacionado con regiones del córtex parietal inferior, del área temporal inferior anterior y del área temporo-occipital. Solo aquellos estímulos que ganan la competición por la representación neural, consiguen acceder a la memoria y al sistema motor, por tanto, a la acción y al comportamiento.

En el modelo de las vías de competición de la atención selectiva, desarrollado por Desimone y Duncan [5] (Fig. 1), la competición de los estímulos por la representación neural, está causada por la limitación de los recursos del sistema visual.

Las emociones desempeñan un papel en la comunicación de intenciones a los demás, pero también pueden desempeñar el papel de guía cognitiva. Así, Arend y Botella [6] han mostrado que el parpadeo atencional se ve disminuido en pacientes con alto grado de ansiedad, indicando que éstos procesan más rápidamente (o incluso automáticamente) los estímulos emocionales. Las variables afectivas se han sumando ya a ese grupo de factores que sabemos modulan la atención.

Según el modelo de Lang sobre emoción [7], ésta es una predisposición para la acción, resultante de la ante estímulos significativos para el

activación de determinados circuitos cerebrales

organismo, que cuando se activan originan las manifestaciones fisiológicas, conductuales y subjetivas de las emociones. Existen datos que sugieren que los estímulos emocionales activan regiones cerebrales “automáticamente” (como la amígdala), inmunes al control atencional [8]. No obstante, Pessoa et al [9] afirman que el procesamiento de estímulos con contenido emocional no es automático y requiere algún grado de atención.

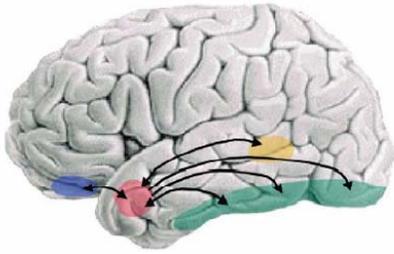


Figura 2. Conexiones de la amígdala. En verde las áreas de procesamiento visual occito-temporal, en naranja el surco temporal posterior, en rojo la amígdala (que no sería visible en la vista lateral, está situada sub-corticalmente) y en azul el cortex orbitofrontal.

La amígdala recibe gran parte de las entradas procesadas visualmente por áreas temporales inferiores [10]. Al mismo tiempo, que esta misma estructura, proyecta a distintos niveles del procesamiento visual, incluido V1 (Fig. 2). Su influencia sobre el procesamiento visual depende de la valencia de los estímulos procesados, lo que le otorga un importante papel en la orientación atencional.

Métodos

Sujetos. El estudio se ha realizado en un grupo de 21 voluntarios sanos, 10 mujeres y 11 hombres, con edades comprendidas entre los 22 y los 35 años (media: 25,9 años). No recibieron a cambio ningún tipo de compensación o remuneración económica. Todos ellos dieron su conformidad para participar en los experimentos.

Estímulos y procedimiento. En condiciones fotópicas (habitación con luz artificial habitual), los sujetos se sentaban a una distancia de 115 cm frente a un monitor de rayos catódicos de 24 x 32 cm. En el monitor se presentó una serie rápida de estímulos consistente en palabras sin ningún tipo de connotación emocional (distractores) y una imagen que podía ser de valencia positiva, negativa o neutra, y activante o no activante. Dentro de la serie podía aparecer o no la palabra objetivo, que siempre era “AGUA”. Al comenzar, los sujetos eran instruidos formalmente para localizar únicamente esa palabra (O2). La tarea consistió en, una vez acabada la serie de estímulos, responder con un “sí” o un “no” a la presencia o ausencia, respectivamente, de la palabra “AGUA”, utilizada como objetivo dentro de la serie de estímulos. Cada respuesta fue anotada. Los estímulos se presentaron mediante el programa EEVOKE (ANT Software, Enschede, Países Bajos).

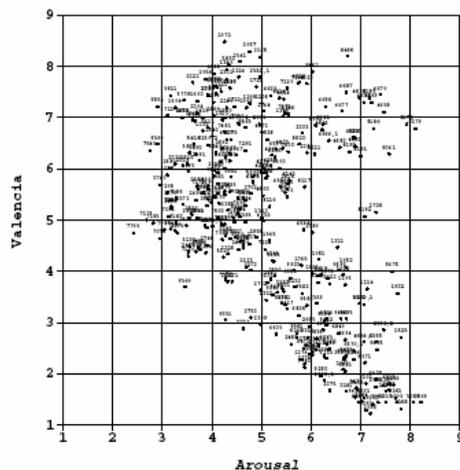


Figura 3. Distribución de las fotografías del IAPS en función de sus niveles de valencia y arousal.

Las 48 imágenes utilizadas fueron seleccionadas del IAPS (Sistema Internacional de Imágenes Afectivas), la versión española está constituida por 832 fotografías en color, que tienen la característica de ser estímulos

perceptuales complejos, y cuya codificación emocional requiere aprendizaje previo y elaboración cognitiva. Además este tipo de estímulos visuales recogen muchos aspectos de la vida real: deporte, moda, paisajes, desastres naturales, pornografía, violencia, etc. actuando como potentes generadores de emoción. Su categorización sigue el modelo de Lang [7], según el cual las manifestaciones fisiológicas, conductuales y subjetivas de las emociones comparten tres dimensiones de respuesta: direccionalidad o valencia (aproximación-avoidancia, agradable-desagradable), intensidad o arousal (nivel de energía requerido para la acción) y control o dominio de la respuesta (continuidad o interrupción de la secuencia conductual). La distribución de las imágenes (Fig. 3) adopta la forma de un boomerang (puntuación entre 1 y 9 por cada dimensión), con dos brazos que salen desde una base

Tabla 1. Valores promedio de las fotografías seleccionadas.

Imagen	Valencia	Arousal	Dominancia
NA	1,71	7,6	2,7
NN	2,59	5,76	3,76
PA	6,87	6,73	5,81
PN	7,67	4,14	5,78
NT	4,95	4,28	5,41

afectivamente neutra y calmada hacia los dos extremos activadores (agradable-desagradable). El brazo que se extiende hacia el polo agradable tiene menor inclinación, junto con mayor dispersión, que el brazo del polo desagradable.

Para este trabajo los valores promedio, de valencia, arousal y dominancia, de las fotografías seleccionadas para cada uno de los grupos fueron los expresados en la tabla 1.

En cada ensayo se presentó una rápida sucesión de palabras escritas en negro sobre un fondo blanco, siempre en el centro de la pantalla, incluyendo una imagen que también aparecía centrada. Los estímulos permanecieron en la pantalla 41 ms y el tiempo interestímulo fue de 68 ms. En el 50% de los ensayos con posterioridad a la fotografía aparecía la palabra objetivo, "AGUA", mientras que en la otra mitad de los ensayos dicha

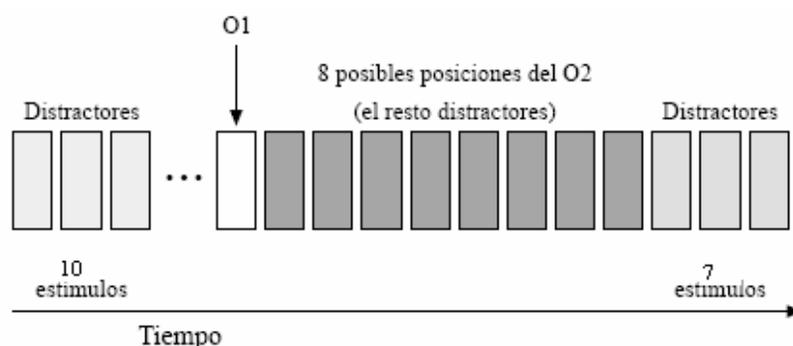


Figura 4. Representación del procedimiento llevado a cabo.

palabra no aparecía. La posición de la palabra “AGUA” podía variar, pudiendo aparecer en cualquiera de las ocho posiciones siguientes a la fotografía, posiciones entra las cuales transcurrían aproximadamente 100 ms. Las palabras distractoras estaban repartidas de la siguiente manera: 10 antes de la imagen (O1), 7 después de la palabra objetivo “AGUA” (O2) y según la posición ocupada por O2, las correspondientes entre la imagen y el mismo (Fig.4).

En total se realizaron 191 ensayos experimentales por cada sujeto. En el diseño experimental se consideraron las siguientes variables:

- Variables dependientes: Total de errores en la detección de la palabra “AGUA”.

- Variables independientes: *Posición de la palabra “AGUA” dentro de la serie*: P1 (110ms), P2 (220ms), P3 (330ms), P4 (440ms), P5 (550ms), P6 (660ms), P7 (770ms) y P8 (880ms). *Valencia de la imagen*: Neutra, Positiva o Negativa. *Arousal de la imagen*: Activante o No activante. *Sexo*: Hombre o Mujer.

Dado la ausencia de normalidad de la variable registrada, el análisis matemático fue llevado a cabo a través del paquete estadístico SPSS, y consistió en pruebas no paramétricas para k muestras relacionadas (Prueba de Friedman), y tablas de contingencia para las comparaciones en función de la variable “sexo”.

Resultados

El análisis de cada una de las variables por separado reflejó claramente, como se muestra en la figura 5, un mayor número de errores en las posiciones P2 y P3, es decir, cuando la palabra “AGUA” ocupa la posición segunda y tercera tras la visión de la imagen, entre los 220 y 330 ms. Este efecto ha sido hallado en previas investigaciones y por numerosos autores, y que se conoce con el nombre de Parpadeo Atencional. Este aumento del número de errores en la P3 fue estadísticamente significativo ($p < 0,04$) cuando se comparó con los de la posición 4 y 6. Mientras que en el caso de la P2 solo se obtuvo significación con P4 ($p = 0,016$). Probablemente si aumentásemos la muestra poblacional estas diferencias se acentuarían mucho más.

Cuando el sumatorio de la cantidad de errores se realizó en función del tipo de imagen (Fig. 6) da como resultado la igualdad entre imágenes positivas activantes (PA) y neutras (NT). Con las imágenes negativas activantes (NA), negativas no activantes (NN), y sobre todo con las positivas no activantes (PN), se observa una reducción de los errores. Esta reducción fue

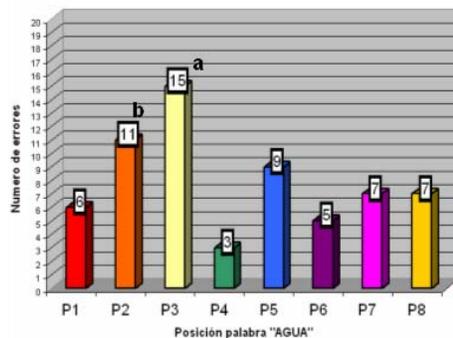


Figura 5. Errores cometidos en las distintas posiciones ocupadas por la palabra “AGUA”. ^a $p < 0,04$ cuando se compara con P4 o P6. ^b $p = 0,016$ cuando se compara con P4

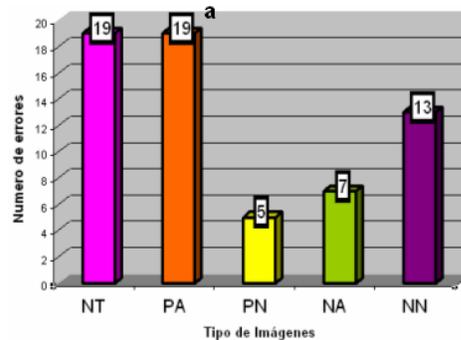


Figura 6. Errores cometidos en función del tipo de imagen utilizada. ^a $p = 0,02$ cuando se compara con PN.

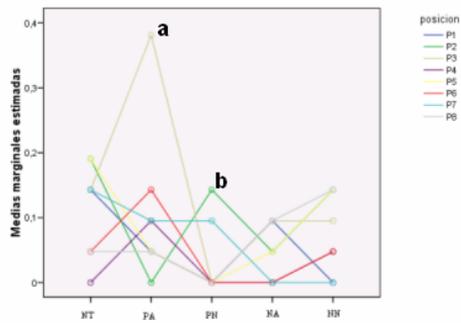


Figura 7. Medias marginales de los errores cometidos en cada posición, en función del tipo de imagen utilizada. ^a $p = 0,012$ en comparación con el resto de combinaciones. ^b $p = 0,026$ en comparación con el resto de combinaciones.

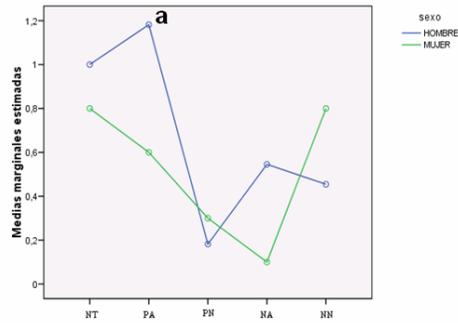


Figura 8. Medias marginales de los errores cometidos en función del tipo de imagen, en hombres y en mujeres. ^a $p = 0,012$ para los hombres en la posición 3 con respecto al resto de combinaciones.

estadísticamente significativa entre las imágenes PN y PA ($p = 0,02$).

Se realizó una prueba de Friedman para combinar cada uno de los tipos de imagen con el orden ocupado por el O2 dentro de la serie (Fig. 7). En este análisis se observa que las únicas interacciones significativas se dan entre las imágenes positivas activantes (PA) y la posición 3 ($p = 0,012$), y en menor medida entre las positivas no activantes (PN) y la posición P2 ($p = 0,026$).

Si a la relación entre las dos variables anteriores, le añadimos el factor sexo, las gráficas realizadas adquieren diferentes matices (Fig. 8). Los errores de los hombres parecen centrarse en las imágenes positivas activantes (PA), mientras que en las mujeres las cantidades están mucho más igualadas, existiendo un mayor número de errores en las negativas no activantes (NN). Entre estas diferencias, resalta también los errores en imágenes negativas activantes (NA), marcadamente superiores en el caso de los varones con respecto a los de las mujeres. Mediante tablas de contingencia para cada uno de los tipos de imagen, en función del sexo y de la posición del O2, los resultados muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las imágenes, con la excepción, de nuevo, de

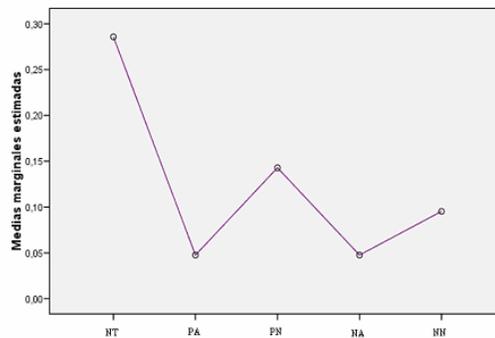


Figura 9. Medias marginales de la cantidad de falsas alarmas según el tipo de imagen.

las positivas activantes (PA) en la posición 3, que se muestran significativas para los varones ($p = 0,012$), pero no para las mujeres ($p > 0,05$). Es decir, la relación anteriormente expuesta entre las imágenes positivas activantes y P3, se debe básicamente a los hombres, que parecen fallar más a menudo cuando se combinan estos tres factores.

El sumatorio de las falsas alarmas muestra que, en general, la cantidad de estas es escasa. Concretamente, éstas representan un 0,0039% del total de respuestas. Si se realiza un análisis de Friedman para analizar si existen diferencias en esta variable en función del tipo de imagen, la significación que se obtiene en todas las posibles combinaciones es $p > 0,05$; pero es posible que esto se deba a la falta de muestra poblacional, ya que el contraste entre las neutras y el resto resulta patente (Fig. 9).

Discusión

La poca cantidad de falsas alarmas cometidas en relación a la gran cantidad de ensayos experimentales indica un buen estado de atención durante la realización de la prueba, por parte de los sujetos. No obstante, el mayor número de estas mismas en imágenes neutras, indica que en este subgrupo existe un mayor grado de contestaciones al azar, debidas posiblemente a un menor grado de alerta, o a un mayor grado de distraibilidad.

En los ochenta numerosos investigadores se interesaron por el estudio de las relaciones entre estados afectivos y cognición. Desde entonces, este ámbito de investigación ha sufrido un extraordinario auge, desentrañando algunas de las influencias mutuas entre procesos básicos como la atención, memoria, aprendizaje o pensamiento, y procesos de naturaleza afectiva [11]. Incluso han adaptado numerosas tareas experimentales que se venían utilizando en la psicología cognitiva con este fin. Un ejemplo muy significativo y utilizado ha sido el Stroop emocional, en la que aparecen estímulos de diferente valencia que pueden tener connotaciones positivas, negativas o neutras. En estos estudios se utilizan palabras de diferentes colores, aunque hay quien añade material pictórico, como expresiones faciales. Estos estudios tratan de mostrar la interdependencia entre los procesos afectivos y los cognitivos [12].

En este estudio hemos encontrado que las imágenes emotivas, en general, disminuyen la cantidad de errores en los sujetos, es decir, mejoran la detección de la palabra objetivo (O2) independientemente de la posición que ocupe, son capaces de aumentar la alerta atencional, lo cual favorece la tarea en sí, prueba de ello, es que en todas ellas se cometen menos errores y menos falsas alarmas que con las imágenes neutras. Aunque hay una excepción en el caso de las imágenes PA, sorprendentemente igualadas en resultados con las neutras. Este dato tan llamativo podría explicarse por el hecho de que el resultado en este tipo de imágenes sí que se ve influido por la posición que ocupa la palabra "AGUA"; produciéndose lo que hemos llamado, efecto de parpadeo atencional. Lo cuál hace suponer que, a pesar de que se instruye a los sujetos expresamente en que su única tarea es detectar O2, las imágenes PA, sobre todo para los varones, captan mucho la atención, hasta tal punto, que perjudican la detección del verdadero objetivo [13]. Llegando a un estado en el cual, la orientación de la atención pasa de estar dirigida por una meta (orientación voluntaria o endógena), a estar regida por las características del estímulo (orientación exógena o involuntaria). Por esto mismo, las imágenes NT y PA no se igualan en falsas alarmas, pues las explicaciones a su común resultado son muy distintas, en el primer caso, la imagen no mejora la alerta ni el procesamiento de la información, mientras que en el segundo caso, todo se debe a que la imagen produce lo que se conoce como captura atencional.

El efecto de parpadeo atencional normalmente se produce cuando debe atenderse a dos estímulos que aparecen dentro de una secuencia rápida de estímulos que se superponen, y describe el déficit producido en la detección del segundo estímulo cuando éste aparece antes de que hayan transcurrido 300-400ms tras la presentación del primero, tiempo que coincide con lo que hemos llamado en este trabajo P3 [14]. En general, los SOAs (tiempos) cortos o situaciones próximas entre O1 y O2, están asociadas a una mejora de la precisión para localizar los estímulos, independientemente de que estén precedidos por imágenes agradables o desagradables, en comparación con las neutras. Además hay autores que sugieren una modulación del parpadeo atencional en relación con la intensidad de la emoción de los estímulos, y no en función de que la palabra sea positiva o negativa. La facilitación en la precisión de estímulos con mayor arousal supone la idea de que este tipo de información se procesa mejor [15].

En un estudio reciente, en pacientes con ansiedad subclínica han mostrado como el valor emocional de los estímulos influye sobre los límites temporales de la atención, y que la posibilidad de atender a diferentes estímulos que se suceden en el tiempo queda aún más limitada en el momento en que atendemos de forma explícita al valor afectivo del estímulo negativo [16].

Respecto al efecto de valencia encontrado, siguiendo los principales modelos teóricos acerca del parpadeo atencional, podemos considerar que su explicación radica en la diferente cantidad de recursos atencionales demandados en función de la valencia del O1 (imagen). El parpadeo atencional se produce fundamentalmente porque el acceso a consciencia de cualquiera de los dos objetivos requieren recursos atencionales, y el sistema asigna en primer lugar esos limitados recursos al acceso a consciencia al estímulo con valencia emocional, más concretamente, a los categorizados como PA.

En su conclusión general, Fenske y Eastwood [17] afirman que el afecto negativo constriñe la atención en comparación con la emoción neutra y que el afecto positivo dilata el foco de atención con respecto al neutro. Según ellos, las caras felices son identificadas más rápidamente y mejor que las caras negativas. La constricción de la atención causada por el estrés o el arousal emocional entra dentro de este mismo grupo. La explicación vigente para este hallazgo, es que existe una competición por los recursos atencionales, con vías que mejoran la respuesta neural ante algunos objetos y suprimen la misma ante otros. Es decir, el afecto facial constituiría una señal capaz de variar la amplitud de estas vías en función de la emoción expresada.

Los resultados obtenidos vuelven a poner de manifiesto la existencia de competición por los limitados recursos atencionales. Y dentro de esta lucha, la amígdala tiene un papel principal. Gracias a Pessoa et al [9] sabemos que la respuesta de la amígdala a los estímulos emocionales no es automática y requiere de la atención, sus resultados muestran que todas las regiones cerebrales responden de forma distinta a las caras emocionales, incluida la amígdala, pero solo cuando existen suficientes recursos atencionales para su procesamiento. Lo cual, es consistente con la proposición de Lavie [18], que indica que cuando el procesamiento requerido por los objetivos de una tarea saturan la capacidad de la atención, los estímulos irrelevantes no son procesados; pero esto no ocurre con la expresión emocional, se trata de una categoría privilegiada de objetos inmunes a los efectos de la atención. Es decir, los estímulos emocionales compiten por los recursos de procesamiento y tienen ventajas de competición con respecto a los estímulos neutros (Figura 10). Anderson y Phelps [10] sugieren que la señal originada en la amígdala ayuda a incrementar la sensibilidad perceptual de estos estímulos.

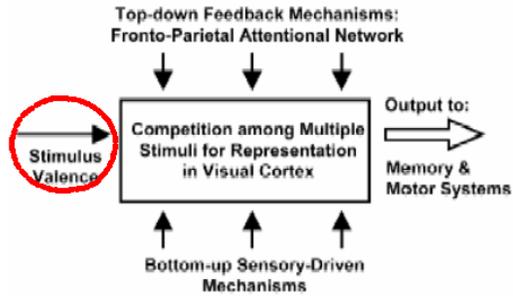


Figura 10. Representación del modelo de Desimone y Duncan (1995), al que se ha añadido, los estímulos de valencia emocional como vía de competición adicional.

Destacada es también la diferencia entre hombres y mujeres en cúmulo de errores según tipo de imagen presentada, los gráficos parecen no tener nada en común. En los hombres, la mayoría de los errores se concentran en las imágenes de sexo, deportes y mutilaciones, mientras que en las mujeres todo parece estar mucho más repartido, con fallos más comunes en imágenes que reflejan tristeza, aunque también en las referentes al sexo. Si como se está exponiendo, la amígdala es la que selecciona y define la preferencia por unos estímulos u otros, está claro que los favoritismos de la misma varían en el cerebro

femenino y masculino. Esto no tiene gran misterio, si tenemos en cuenta que ya en la configuración del sistema nervioso de los embriones XX y XY se dan diferencias, debido en parte a las distintas hormonas que marcan su crecimiento. Esto sumado a las diferencias de aprendizaje que se dan dentro de la sociedad, da como resultado las desigualdades emocionales que se hacen patentes en este estudio.

Moltó et al. [19] en su trabajo con las fotografías que componen el IAPS han mostrado que los varones tienden a estimar como más activadoras las imágenes del extremo agradable (eróticas, deportes), mientras que las mujeres tienden a estimar como más activadoras las diapositivas desagradables (mutilaciones, armas). La fuerza de evitación ante un estímulo aversivo es mayor que la fuerza de atracción hacia un estímulo apetitivo. Un menor gradiente para las motivaciones positivas indicaría la presencia de un sesgo hacia la positividad cuando ninguno de los dos sistemas motivacionales está fuertemente activado, por el contrario un mayor gradiente para las motivaciones negativas indicaría un sesgo hacia la negatividad cuando los niveles motivacionales son muy altos. Las mujeres, en general, otorgan a las imágenes un mayor “arousal”. Además, los datos encontrados por este equipo investigador sugieren, mayor sesgo hacia la negatividad en el caso de las mujeres, y mayor sesgo hacia la positividad en el caso de los hombres.

Posteriormente, en otros estudios realizados, se ha encontrado que existen diferencias de género en el recuerdo de imágenes (del IAPS) de distinto contenido afectivo. Las diferencias de género en función de los contenidos concretos se hacían evidentes en la cuantía del recuerdo. Así, los varones tendían a recordar una mayor proporción de imágenes sobre desnudos del sexo opuesto, actividades deportivas y escenas de violencia que las mujeres [20]. Además, todos estos datos son coherentes con los expuestos por estudios psicofisiológicos sobre la desigualdad de la reactividad en diferentes parámetros fisiológicos, de varones y mujeres ante estímulos de diferente contenido emocional [21].

Conclusiones

Este estudio demuestra que el valor emocional de los estímulos influye sobre los límites temporales de la atención; y marca la ventaja de acceso al procesamiento que tienen ciertos estímulos de valencia afectiva y “arousal”. A lo que se añade, las diferencias puntualizadas por el sexo, debidas a que la mayoría de los estímulos emocionales vienen definidos por experiencia y aprendizaje. La combinación de dos procesos cognitivos, como son la emoción y la atención, sigue siendo un campo abierto a la investigación, con muchas

preguntas sin respuesta y con una falta patente de conocimiento de la interacción fisiológica de ambos aspectos.

Agradecimientos

El presente trabajo no se hubiese podido llevar a cabo sin la participación voluntaria de todos los sujetos. De igual manera agradecer la ayuda prestada por la Dra. M^a Teresa Miranda. Por último, un agradecimiento especial a Jaime Vila, por su aportación de las imágenes IAPS.

Referencias

1. Ollari JA: **Sistemas Atencionales y Negligencia Unilateral**. *Revista de Neurología* 2001, 32 (5): 478-483.
2. Broadbent DE, Broadbent MH: **From detection to identification: response to multiple targets in rapid serial visual presentation**. *Perception and psychophysics* 1987, 42:105-113.
3. Shapiro K, Arnell KM, Raymond JE: **The attentional blink**. *Trends in Cognitive Science* 1997, 1:291-299.
4. Shapiro K, Raymond JE, Arnell K: **Attention to visual pattern information produces the attentional blink in RSVP**. *Journal of experimental Psychology: Human Perception and Performance* 1994, 20:357-371.
5. Desimone R, Duncan J: **Neural mechanisms of selective attention**. *Oxford Annual Review Neuroscience* 1995, 18:193-222.
6. Arend I, Botella J: **Emotional stimuli reduce the attentional blink in subclinical anxious subjects**. *Psicothema* 2002, 14:209-214.
7. Lang PJ: **The emotion probe: Studies of motivation and attention**. *American Psychologist* 1995, 50:372-385.
8. Ohman A, Flykt A, Esteves F: **Emotion drives attention: Detecting the snake in the grass**. *Journal of experimental Psychology: General* 2001, 130:466-478.
9. Pessoa L, Kastner S, Ungerleider LG: **Attentional control of the processing of neutral and emotional stimuli**. *Cognitive Brain Research* 2002, 15:31-45.
10. Anderson AK, Phelps EA: **Lesions of the human amygdala impair enhanced perception of emotionally salient events**. *Nature* 2001, 411:305-309.
11. Rueda R, Tudela P, Lupiáñez J: **Efecto de facilitación semántica en la tarea Stroop: Implicaciones para el estudio emocional**. *Psicothema* 2000, 12:221-227.
12. Acosta A, Lupiáñez J: **Efectos del Priming en la tarea Stroop emocional de nombrar color: ¿Modulación automática o estratégica de la interferencia?** *Revista Electrónica de Motivación y Emoción* 2002, 1-19. (<http://reme.uji.es>).
13. Fox E, Russo R, Georgiou G: (2009). **Anxiety modulates the degree of attentive resources required to process emotional faces**. *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience* 2009, 2:52-69.
14. Chun MM, Potter MC: **A two-stage model for multiple target detection in Rapid Serial Visual Presentation**. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance* 1995, 21:109-127.
15. Keil A, Ihssen N: **Identification facilitation for emotionally arousing verbs during the attentional blink**. *Emotion* 2004, 4:23-35.
16. Vaquero J, Frese B, Lupiáñez J, Megías J, Acosta A: **El efecto de Parpadeo Atencional: influencia de las palabras negativas en una tarea de categorización de la valencia afectiva**. *Psicothema* 2006, 13:525-530.
17. Fenske MJ, Eastwood JD: **Modulation of focused attention by faces expressing emotion: evidence from flanker tasks**. *Emotion* 2003, 3:327-343.
18. Lavie N: **Perceptual load as a necessary condition for selective attention**. *Journal Experimental Psychology Human* 1995, 21:451-468.
19. Moltó J, Montañés S, Poy R, Segarra P, Pastor MC, Tormo MP, Ramírez I, Hernández MA, Sánchez M, Fernández MC, Vila J: **Un nuevo método para el estudio experimental de las emociones: El Internacional Affective Picture System (IAPS). Adaptación española**. *Revista de Psicología General y Aplicada* 1999, 52:55-87.

20. Pastor MC, Segarra P, Poy R, Montañés S, Tormo M P, Moltó J: **Efecto diferencial del contenido específico de estímulos del IAPS sobre la reactividad fisiológica de varones y mujeres.** Comunicación oral presentada en el II Congreso de la Sociedad Española de Psicofisiología 2000 abril, Murcia, España.
21. Dennis T, Chao-Cheng Chen: **Emotional face processing and attention per-formance in three domains: neurophysiological mechanisms and moderating effects of trait anxiety.** *Int. J. Neurophysiological* 2007, 65(1):10-19.

CAPITULO 8

***Atención visual: influencia de la posición y distractores en
estímulos visuales tipo Stroop***

***E.M. Rodriguez Torrecillas
I. Crespo Martín
B. Rapela Orta
R. Mancebo Azor
J.M. Rodriguez Ferrer***

Atención visual: influencia de la posición y distractores en estímulos visuales tipo Stroop

Eva M. Rodríguez Torrecillas, Iris Crespo Martín, Bárbara Rapela Orta, Rafael Mancebo Azor, José M. Rodríguez Ferrer

Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva. Instituto de Neurociencias. Universidad de Granada.

Autor para correspondencia:

Eva María Rodríguez Torrecillas, Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva, Instituto de Neurociencias. Telf.: 958 241575

Dirección de correo electrónico:

EMRT: rte880@yahoo.es

Resumen

Introducción. La detección de estímulos visuales está influenciada por diversos aspectos como son su posición y excentricidad en el campo visual, así como por el tipo de estímulos utilizados, y el número y tipo de distractores. Todos estos aspectos están influidos por la atención selectiva, una función cognitiva compleja que permite dirigir la atención a aspectos relevantes del medio, obviando los irrelevantes. Dicha función presenta un sistema anatómico complejo, formado por un conjunto de redes en áreas específicas del cerebro y una lateralización cerebral. **Objetivo.** Se estudió cómo afectan la posición en el espacio del estímulo objetivo, la influencia del número y características de los distractores, así como la mediación de la atención selectiva en la detección de estos estímulos. **Métodos.** Se midieron los tiempos de reacción (TR) empleados por 20 personas para detectar el estímulo objetivo (tipo Stroop) en dos condiciones experimentales, administradas a través de una pantalla de ordenador. Estas condiciones tuvieron diferente distribución y número de elementos (5 dispuestos en forma de equis y 9 en una matriz de 3x3). **Resultados.** En ambas condiciones experimentales, los TR más favorecidos fueron los empleados en la posición 1 (campo visual izquierdo superior) y 5 (centro). Por el contrario, los TR de las posiciones colocadas en la derecha de la pantalla fueron los más altos. Excepto en las posiciones 1 y 5, los TR fueron mayores en la condición experimental de nueve elementos. **Conclusiones.** En conclusión, la cantidad de distractores, no afecta al TR de la posición central y superior izquierda y por tanto no se puede establecer una relación directa entre la cantidad de distractores y el TR, como se afirma en estudios previos.

Palabras clave. Atención visual. Distractores. Posición. Excentricidad. Campo visual. Stroop.

Introducción

El término “atención” ha sido ambiguo y difícil de definir desde sus inicios. Sin embargo, se puede definir como un proceso por el cual se focaliza selectivamente la conciencia, filtrando y desechando la información no deseada [1, 2 y figura 1]. La modalidad sensorial de la atención más estudiada ha sido la visual y muchos son los enfoques y mecanismos empleados para explorarla. La atención selectiva visual, convierte la atención en un proceso activo por el que deben obviarse los estímulos irrelevantes y centrarse en los relevantes [3, 4].

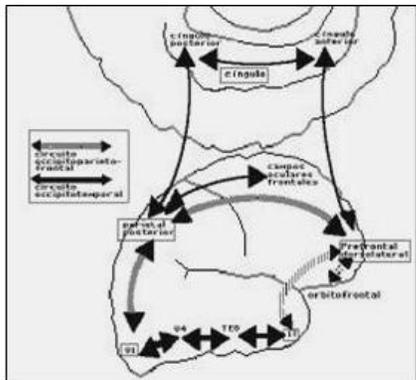


Figura 1. Principales conexiones corticales implicadas en la atención visual. Tomado de Estévez-González et al. [1]. La atención es un sistema complejo que anatómicamente está formado por un conjunto de redes en áreas específicas del cerebro. En la interconexión de las diferentes áreas, los científicos destacan la importancia de dos vías: La vía dorsal que se inicia en la misma área V1, interconecta con el cortex parietal posterior y de aquí a la corteza prefrontal dorsolateral. La vía ventral (V2 y V4) está implicada en la supresión de la respuesta de los distractores y un aumento posterior de la respuesta neuronal, correspondiente a la información relevante. Esta vía también está relacionada con un beneficio en el procesamiento del estímulo que ocupa la localización espacial atendida [5].

Algunos de estos enfoques son la Tarea de Orientación (Posner), de Flancos (Eriksen) y la Tarea Stroop [2]. Estos tres enfoques presentan un conflicto estimular y/o de respuesta (congruente e incongruente) [6, 7]. La Teoría Atencional de Posner ha sido la más estudiada. Esta teoría (Posner & Petersen, 1990; Posner & Roethbart, 1991; Posner & Dehaene, 1994) [8-10] mantiene que las manifestaciones atencionales están producidas por sistemas atencionales separados, aunque relacionados entre sí. Además, algunos estudios recientes han combinado estas tareas para estudiar dicho mecanismo, planteando nuevos interrogantes [11-13].

Otro de los paradigmas más señalados en la atención visual es la metáfora del “foco de luz”. Aquí la atención selecciona una localización del campo visual facilitando el procesamiento de cualquier estímulo situado dentro de esa región. Según Eriksen y Eriksen [7], el área de la zona

atendida tendría aproximadamente 1º de ángulo visual de diámetro, aunque Posner, Snyder y Davidson [14] pensaban que el tamaño del foco atencional puede ser variable. Además, de los paradigmas atencionales anteriormente citados, hay que tener en cuenta aspectos relacionados con la búsqueda visual de objetos como son la excentricidad, la influencia de los campos visuales y de los movimientos sacádicos [15].

El Efecto de excentricidad hace referencia a que cuando los elementos objetivo se presentan en el punto de fijación son detectados y localizados de forma más eficaz que cuando ocupan posiciones más periféricas. En este sentido, cuando la señal de guía atencional es imperfecta o nula, los sujetos deberán realizar una exploración aleatoria de la exposición en la que se priorizarán las localizaciones centrales [16, 17]. En relación a este efecto, Chen y Treisman [18], señalaron que la inhibición de un distractor es más efectiva en una localización central que en una periférica.

Con respecto a los campos visuales, Ponte et al. [17], señalaron que los estímulos que aparecían en el campo visual izquierdo se detectan más rápidamente. Esto se puede explicar como consecuencia de la mayor especialización del hemisferio cerebral derecho en este tipo de tareas [19].

Este estudio intenta comprobar cómo afecta la posición en el espacio del estímulo objetivo a su detección, así como la influencia del número de distractores. Además, hay que tener en cuenta las características de dichos distractores (estímulos de la tarea Stroop de carácter incongruente) y si los tiempos de reacción serán mayores, ya que los participantes deben analizar las características intra-objeto, así como la posición que estos ocupan en el espacio. Se hipotetizó, que las posiciones más favorecidas en ambas condiciones serían la central y la superior izquierda. Del mismo modo, que en los ensayos donde el número de distractores era más elevado, los TR serían superiores. En cuanto a la fase de entrenamiento, la hipótesis fue que el TR sería mayor en los estímulos incongruentes que en los congruentes.

Métodos

Participantes. El estudio se ha realizado en un grupo de 20 voluntarios sanos (10 mujeres y 10 hombres, con edades comprendidas entre los 22 y los 35 años, media= 25,95 años). Todos los participantes tenían visión normal o corregida con lentes graduadas en el momento de la prueba y dieron su conformidad para participar en la investigación.

Estímulos y procedimiento. Los estímulos utilizados en este estudio consistieron en palabras que denominaban colores, escritas en mayúscula y con el mismo número de letras y sílabas (“rojo” y “azul”). Estos estímulos eran incluidos en ensayos, sobre un fondo blanco, donde la posición y el número de estos variaban en función de la fase experimental en la que los sujetos se encontraban. Los ensayos eran mostrados en un monitor de rayos catódicos de 24 x 32 cm. El orden de los ensayos y el tiempo entre estos se determinó mediante la aplicación informática EEVOKE en su versión 2 (ANT Software. Enschede, Países Bajos). Además, fue necesario un mando de consola para registrar el tiempo de reacción de los participantes. Este registro se llevó a cabo mediante el programa ASA en su versión 3 (Advance Source Analysis, ANT Software).

Las palabras incluidas en el estudio podían definirse como objetivo o distractor dependiendo del color en el que eran presentadas. Si la semántica y el color coincidían (rojo escrito en rojo y azul escrito en azul), la palabra era congruente y tenían carácter de objetivo. Sin embargo, las palabras que no coincidían en estos dos aspectos, eran denominadas incongruentes (rojo escrito en azul y azul escrito en rojo) y tenían carácter de distractor. Estos estímulos fueron incluidos en ensayos, presentados en el monitor de un ordenador a una distancia de 115 cm de los participantes. El tiempo que se mantenía cada ensayo en pantalla fue de 5 segundos y el tiempo entre estos fue de un segundo.

Los participantes al detectar el estímulo objetivo debían apretar un botón de un mando lo más rápido posible. Cada participante respondió un total de 288 ensayos divididos en tres condiciones experimentales.

La primera condición tenía carácter de entrenamiento y estaba formada por 64 ensayos. Cada ensayo constaba de un solo elemento (congruente o incongruente), en el centro de la pantalla, sobre un fondo blanco. Los ensayos se dividían en 4 bloques de 16

Tabla 1. Distribución de los ensayos en las diferentes condiciones experimentales. Cada una de las fases se divide en diferentes bloques, aleatorizando la misma cantidad de ensayos válidos y controles.

FASE ENTRENAMIENTO				CONDICIÓN EQUIS		CONDICIÓN 3X3	
2 Bloques Congruent		2 Bloques Incongr		1er Bloque	2º Bloque	1er Bloque	2º Bloque
8 Obj	8 Obj	8 Obj	8 Obj	P1-4 P2-4 P3-4 P4-4 P5-4	P1-4 P2-4 P3-4 P4-4 P5-4	P1-4 P2-4 P3-4 P4-4 P5-4 P6-4 P7-4 P8-4 P9-4	P1-4 P2-4 P3-4 P4-4 P5-4 P6-4 P7-4 P8-4 P9-4
				20	20	36	36
8 Con	8 Con	8 Con	8 Con	20 Controles	20 Controles	36 Controles	36 Controles
16	16	16	16	40 Ensayos	40 Ensayos	72 Ensayos	72 Ensayos
64 ENSAYOS				80 ENSAYOS		144 ENSAYOS	
TOTAL 288 ENSAYOS							

ensayos cada uno. Dos bloques donde el sujeto sólo tenía que responder lo más rápido posible al detectar el estímulo, presionando el botón, al congruente y otros dos bloques donde se debía responder al incongruente. De esos 16 ensayos, el 50% fueron controles.

En la segunda condición experimental los ensayos estaban compuestos por cinco elementos organizados en forma de equis. Dentro de esta condición, el estímulo objetivo (siempre la palabra congruente) iba cambiando de posición (1, 2, 3, 4 ó 5) aleatoriamente el

Tabla 2. Ejemplo de ensayo y esquema de las posiciones analizadas y de los elementos que han sido utilizados como objetivo y distractor.

Se puede ver como en el primer recuadro, el estímulo objetivo se presenta en la posición 5 (posición central) y el resto de elementos (distribuidos en las posiciones restantes) difieren del objetivo o en el color en que está escrita la palabra azul o en la palabra (rojo) escrita en el mismo color. Lo mismo ocurre con los estímulos presentados en la condición de nueve elementos.

<p>AZUL AZUL</p> <p style="margin-left: 100px;">AZUL</p> <p>ROJO ROJO</p>	<p>POS 1 POS 2</p> <p style="margin-left: 100px;">POS 5</p> <p>POS 3 POS 4</p>
<p>ROJO ROJO AZUL</p> <p>ROJO ROJO AZUL</p> <p>AZUL AZUL ROJO</p>	<p>POS 1 POS 2 POS 3</p> <p>POS 4 POS 5 POS 6</p> <p>POS 7 POS 8 POS 9</p>

mismo número de veces. Aquí los sujetos debían responder presionando el botón lo más rápido posible al detectar el estímulo objetivo en cualquiera de las posiciones. Por tanto, se le presentaba al sujeto dos bloques de 40 ensayos cada uno, divididos en 20 controles (no había estímulo objetivo, todos eran distractores y no debía emitirse ninguna respuesta) y 20 ensayos válidos en los cuales el sujeto sí debía responder. En estos últimos bloques el estímulo objetivo aparecía cuatro veces para cada posición. Por tanto, en esta condición había un total de 80 ensayos.

En la última condición, cada ensayo estaba formado por 9 elementos (3 filas x 3 columnas). El número total de ensayos fue de 144, divididos en dos bloques. Cada bloque constó de 72 ensayos, donde el sujeto sólo debía emitir la respuesta (presionando el botón lo más rápido posible al detectar el estímulo objetivo en cualquiera de las 9 posiciones) en 36 de ellos para cada bloque (ensayos válidos), ya que los 36 restantes fueron controles. De la misma manera que en la condición anterior, el estímulo objetivo (congruente) se presentaba 4 veces en cada una de las nueve posiciones posibles de forma aleatoria.

La tabla 1 muestra de forma esquemática, la distribución de los 288 ensayos totales. De la misma manera, la Tabla 2 muestra dos ejemplos de ensayos con las equivalencias de las posiciones analizadas.

Resultados

El análisis de datos no se aplicó sobre los ensayos control. Dentro de estos ensayos sólo se tuvo en cuenta el porcentaje de falsas alarmas que cometieron los sujetos. El análisis estadístico, se realizó para los ensayos válidos, descartando los ensayos con error y aquellos en los que el tiempo para dar la respuesta era sobrepasado. En las tres condiciones experimentales, el análisis estadístico se llevó a cabo con la versión 15.0 para Windows del paquete estadístico SPSS, el cual se aplicó sobre las medias del tiempo de reacción (TR) empleado para emitir la respuesta por cada sujeto en cada posición.

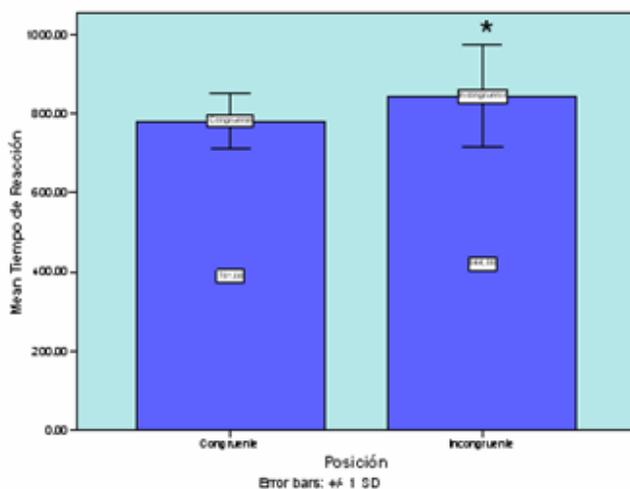


Figura 2. TR obtenidos por los sujetos al detectar los estímulos congruentes e incongruentes. * $p < 0,006$, comparación entre estímulos congruentes e incongruentes.

Los resultados analizados en la fase de entrenamiento, donde los ensayos estaban compuestos por un solo elemento (congruente o incongruente), a través de un Análisis de Varianza Univariante, arrojaron una diferencia significativa ($p < 0,006$), al comparar el tiempo empleado por los sujetos en cada una de las posiciones. La Figura 2 muestra como los sujetos tardaban más en responder a los estímulos incongruentes (846,09)

que a los congruentes (784,09).

En referencia al porcentaje de aciertos y falsas alarmas, no varió mucho de un tipo de estímulo a otro (congruente o incongruente). En los dos tipos de estímulos, los sujetos cometieron la misma tasa de errores 0,63%. Por otro lado, la tasa de falsas alarmas fue de 4,69% para los estímulos congruentes y 5,31% para los incongruentes.

En la condición experimental compuesta por cinco estímulos y tras un Análisis Lineal General Univariante se evidenciaron diferencias significativas (Figura 3). Aunque el TR de los sujetos en la posición 4 es mayor que en las posiciones restantes (1634 ms), la significación sólo se obtuvo con respecto a la posición 1 ($p < 0,004$) y 5 ($p < 0,009$). En la posición 4, los sujetos tardaban 292,13 ms. más en responder con referencia a la 1. Y con respecto a la posición 5, los sujetos necesitaban 274,51 ms más para responder al estímulo objetivo con relación a la posición 4.

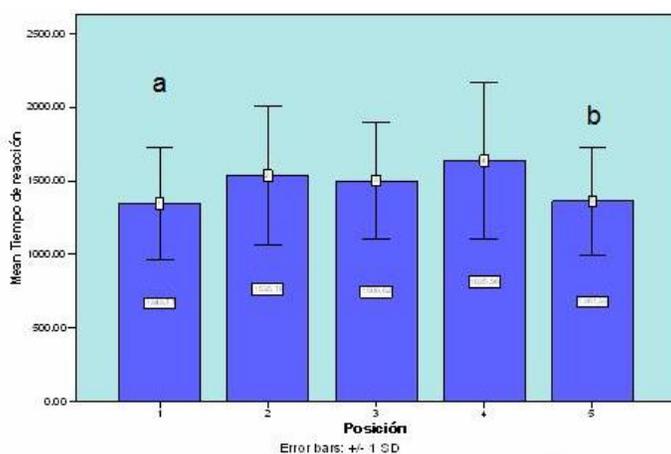


Figura 3. TR obtenidos en la detección del estímulo objetivo (congruente) en la condición experimental de cinco elementos. La comparación de los TR de las cinco posiciones revela dos puntuaciones significativas. (^a $p < 0,004$) comparación de la posición 1 y 4. (^b $p < 0,009$) comparación de la posición 5 y 4.

Por otro lado, en esta condición el porcentaje de error (omisiones) fue de 0,63% y el de falsas alarmas (emitir respuesta cuando no se presenta estímulo) fue de 2,63%.

En la condición experimental de nueve elementos, el Análisis Lineal General Univariante evidenció que los TR empleados en la posición 1 fueron siempre menores que los empleados en las posiciones restantes. En relación con esta posición, se encontró significación con

respecto a las posiciones 3, 6, 7, 8, 9 ($p < 0,000$) y a la 4 ($p < 0,036$). En la segunda posición, las diferencias significativas se encontraron en las posiciones 3, 6, y 9 ($p < 0,001$). En referencia a la posición 3, además de la significación anteriormente citada, hay que señalar las diferencias encontradas en relación a la posición 4 ($p < 0,034$) y la 5 ($p < 0,002$). De la misma manera, en la posición 4, también hubo diferencias significativas relacionadas con las posiciones 6 ($p < 0,035$) y 9 ($p < 0,031$). Por último, en la posición 5, hubo significación en las posiciones 6 ($p < 0,002$) y 9 ($p < 0,001$).

Tabla 3. Diferencias significativas entre las distintas posiciones de la condición de nueve elementos.

	POS 1	POS 2	POS 3	POS 4	POS 5	POS 6	POS 7	POS 8	POS 9
POS 1			P<0,000	P<0,036		P<0,000	P<0,000	P<0,000	P<0,000
POS 2			P<0,001			P<0,001			P<0,001
POS 3	P<0,000	P<0,001		P<0,034	P<0,002				
POS 4	P<0,036		P<0,034			P<0,035			P<0,031
POS 5			P<0,002			P<0,002			P<0,001
POS 6	P<0,000	P<0,001		P<0,035	P<0,002				
POS 7	P<0,000								
POS 8	P<0,000								
POS 9	P<0,000	P<0,001		P<0,031	P<0,001				

La tabla 3 muestra las significaciones de una manera detallada. En otro orden de cosas, el porcentaje de errores fue de 1,66% y el de falsas alarmas de 3,05%. La figura 4 muestra los TR en la condición de nueve estímulos.

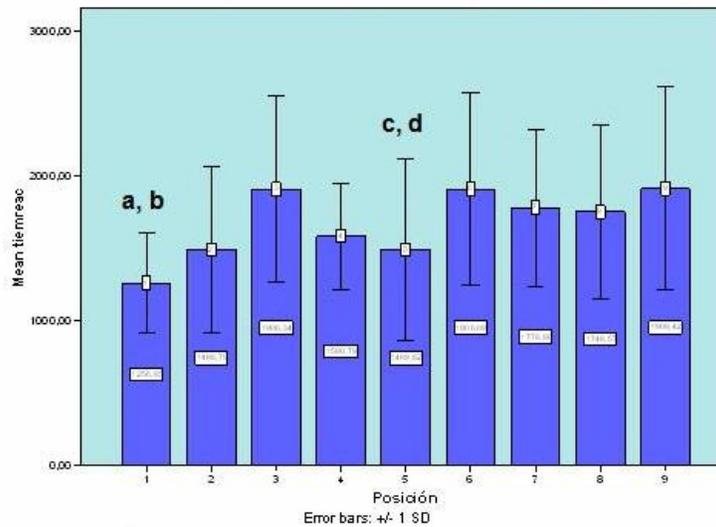


Figura 4. TR obtenidos en la detección del estímulo objetivo (congruente) en la condición experimental de nueve elementos. La comparación entre las distintas posiciones evidencia diferencias significativas. Estas diferencias son las siguientes: (^ap < 0,001) significación entre las posiciones 1 y 3, 6, 7, 8, 9; (^bp < 0,036) significación entre la posición 1 y 4. (^cp < 0,002), comparación entre las posiciones 3,5 y 6 p < .02. (^dp < 0,001), comparación entre las posiciones

Por último, se compararon la ejecución de los sujetos en posiciones equivalentes (Tabla 4) de ambas condiciones (5 y 9 elementos). El objetivo de esta comparación fue determinar la influencia del número de distractores, así como la producida por el campo visual. Para equiparar las posiciones, en la condición de nueve elementos se eliminaron los estímulos de la línea media horizontal y vertical, excepto la posición central y quedando distribuidos de igual manera que en la condición de 5 elementos.

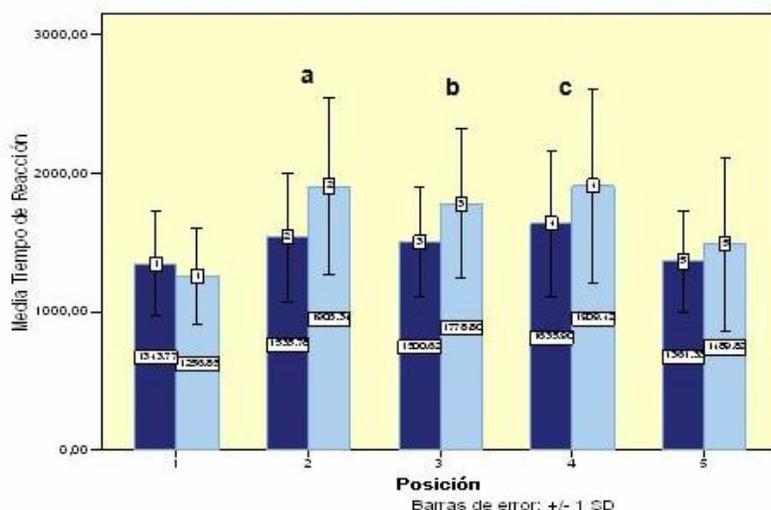


Figura 5. Diferentes significaciones obtenidas al comparar posiciones equivalentes en las distintas condiciones. Estas significaciones son: (^a $p < 0,001$), comparación de la posición 2 en ambas condiciones; (^b $p < 0,005$), comparación de la posición 3 y 4 en ambas condiciones.

Los resultados (Figura 5) obtenidos tras la comparación revelan diferencias significativas en la posición 2 ($p < 0,000$) entre ambas condiciones. Los sujetos tardan 370, 57 ms más en encontrar el estímulo objetivo en esa posición en la condición de nueve elementos. De la misma manera, la equivalencia en la posición 3 y 4 muestra, también, efectos significativos ($p < 0,005$) entre ambas condiciones. Aquí los sujetos tardaron 278,19 ms más en responder para la posición 3 y 273,52 ms más para la 4. Decir además, que los sujetos emplean más tiempo en responder, en la condición de nueve elementos, a la posición 1 y 5 pero no se obtuvo significación al comparar una condición con otra.

Tabla 4. Ejemplo de ensayo y esquema de las posiciones analizadas y de los elementos que han sido utilizados como objetivo y distractor. Se puede ver como en el primer recuadro, el estímulo objetivo se presenta en la posición 5 (posición central) y el resto de elementos (distribuidos en las posiciones restantes) difieren del objetivo o en el color en que está escrita la palabra azul o en la palabra (rojo) escrita en el mismo color. Lo mismo ocurre con los estímulos presentados en la condición de nueve elementos.

<p>AZUL</p> <p>AZUL</p> <p>ROJO</p> <p>ROJO</p>	<p>POS 1</p> <p>POS 5</p> <p>POS 3</p>	<p>POS 2</p> <p>POS 4</p>
<p>ROJO</p> <p>ROJO</p> <p>AZUL</p> <p>ROJO</p> <p>ROJO</p> <p>AZUL</p> <p>AZUL</p> <p>AZUL</p>	<p>POS 1</p> <p>POS 4</p> <p>POS 7</p>	<p>POS 2</p> <p>POS 5</p> <p>POS 8</p> <p>POS 3</p> <p>POS 6</p> <p>POS 9</p>

Discusión

Con el fin de evitar sesgos de género, en cuanto a la búsqueda visual y la atención selectiva, la muestra de este estudio estuvo igualada, es decir, no hubo predominio de ningún sexo, diez hombres y diez mujeres. También decir, que el tiempo de presentación de los estímulos utilizados en este trabajo, están dentro de los utilizados en estudios de características similares [17]. El número bajo de falsas alarmas y errores cometido en las diferentes fases experimentales, revela que los participantes detectaban los estímulos con facilidad.

La fase de entrenamiento, se ideó con la intención de familiarizar a los sujetos con los estímulos y el procedimiento de la tarea, así como para comprobar que los sujetos tardaban más en los estímulos incongruentes. Esto es debido a que en las siguientes fases experimentales el papel de este tipo de estímulos fue de distractores.

Los resultados en esta primera fase, mostraron que los sujetos necesitaron más tiempo para responder a los estímulos incongruentes (846,09 ms) que para responder a los congruentes (784,09 ms). Este patrón en la respuesta de los sujetos mostró acuerdo con paradigmas atencionales importantes. En estos paradigmas se suele comparar la ejecución en una situación en la que dos dimensiones estimulables, una relevante y otra distractora, son congruentes o evocan respuestas compatibles, con una condición en la que la dimensión distractora es incongruente o está asociada a una respuesta incompatible con la elicitada por la dimensión relevante. Normalmente se encuentra que los participantes son más rápidos y precisos para los ensayos compatibles que para los incompatibles. Esto ocurre en la tarea Stroop, donde el TR es mayor en la condición interferencia, ya que debe inhibirse la respuesta automática (la lectura de la palabra) para decir el nombre en el que está escrita la palabra [6].

De la misma manera, en la tarea de Flancos, los sujetos tardan menos tiempo en responder al estímulo objetivo cuando está flaqueado por distractores congruentes al objetivo (HHH), que cuando lo está por incongruentes (LHL). Sin embargo, el efecto puede reducirse cuando la distancia entre los flancos y el objetivo se incrementa. Por tanto, en esta tarea además de jugar un papel importante la atención espacial, también está implicada la proximidad física. Es decir, si el estímulo objetivo y distractor están próximos en el espacio, los recursos utilizados para inhibir el estímulo irrelevante son mayores, haciendo más complicado atender al estímulo objetivo [20].

En el paradigma de Posner, se proponen tres redes atencionales: La Red Atencional Posterior (orientación de la atención hacia el espacio donde aparece el estímulo potencialmente relevante); La Red Atencional de Vigilancia y/o Alerta (se encarga de mantener el "arousal"); y La Red Atencional Anterior (relacionada con la atención ejecutiva, y por tanto con las tareas tipo Stroop). Aquí los TR de los sujetos son superiores cuando la señal de orientación atencional es incongruente (no válida) con el lugar correcto de aparición del estímulo objetivo [2, 5, 11].

Por otro lado, aunque el porcentaje de errores es similar al responder a los dos tipos de estímulos, el porcentaje de falsas alarmas aumenta en un 0,62% en los estímulos incongruentes. Esto puede ser consecuencia de un aumento de la concentración para detectar los estímulos incongruentes y responder a ellos, debido a que es una respuesta que requiere de la resolución de un conflicto estimular (atención ejecutiva o red atencional anterior), como señalan Colmenero et al [5].

Los resultados obtenidos en las condiciones experimentales de cinco y nueve elementos muestran claramente que hay dos posiciones favorecidas. Estas posiciones son la posición 1 (campo visual superior izquierdo) y la 5 (posición central). La comparación de estas posiciones en ambas condiciones, no reveló diferencias significativas. Por tanto se puede concluir, que el efecto de los distractores no influye a estas dos posiciones. Incluso hay que señalar, que en ambas condiciones el TR fue inferior en la posición 1 que en la 5, lo que supondría una superioridad del hemisferio derecho en tareas de atención selectiva [1, 12]. Seguidamente, los sujetos prestarían atención a las posiciones centrales guiados por un efecto de excentricidad [16, 17].

En relación a la superioridad hemisférica derecha en tareas de búsqueda visual y atención selectiva, el TR empleado por los sujetos para responder a los estímulos que se encontraban a la derecha de la pantalla, la respaldaría. Esto es debido a que en ambas condiciones el tiempo necesitado para responder a esas posiciones, fue mayor. En la condición experimental de cinco elementos, el TR para la posición 2 fue de 1535,78 ms y para la cuarta 1636,90 ms (ambas se encuentran a la derecha de la pantalla). El tiempo de esta última posición fue el más alto en esta condición.

Con respecto a la condición de nueve elementos, las posiciones afectadas fueron la 3 (1906,30 ms), la 6 (1906,09 ms) y la 9 (1909,42 ms). De mismo modo que en la condición anterior, la posición que ocupa el campo visual derecho inferior es el más perjudicado a la hora de detectar el estímulo objetivo (posiciones 4 y 9). Otra posible explicación de porqué los sujetos tardan más en las posiciones situadas a la derecha de la pantalla, sería que estos realizan una búsqueda visual serial. Es decir, primero se procesaría un estímulo y después otro, lo cual exige gran atención. Trabajos como los de Carrasco et al. [21] y los de Ponte y Sampedro [22] van en la línea de averiguar cómo influye una guía atencional en el procesamiento de los estímulos.

En otro orden de cosas, el efecto producido por los distractores ha sido descrito por varios autores que señalan que la presencia de un distractor entorpece la respuesta al estímulo objetivo por parte del sujeto [12, 17]. Aunque en las posiciones 1 y 5 no existe perjuicio en la ejecución por el aumento de los distractores, este perjuicio si fue evidente en la equivalencia de las posiciones 2, 3 y 4 al comparar ambas condiciones.

Por otro lado, hay que señalar, que para que los sujetos realizaran la detección del estímulo objetivo entre estímulos distractores similares pero incongruentes, estos debían analizar las dimensiones intra-objeto (atención ejecutiva) además de la posición. Es decir, que para que la respuesta del sujeto fuese correcta, debían procesar conjuntamente la información espacial y la dimensional. Esto puede ser una explicación de porqué los tiempos de reacción fueron tan elevados [11]. Por ejemplo, en la fase de entrenamiento, los tiempos medios de respuesta fueron entre 700 y 900 ms, sin embargo, en las dos restantes condiciones los tiempos medios estuvieron entre los 1000 y 2000 ms.

Conclusiones

A nivel de conclusión, se puede señalar que al igual que en otro tipo de tareas atencionales, los estímulos congruentes se detectan antes que los incongruentes. Además se ha

encontrado que la cantidad de distractores, no afecta al TR de la posición central y campo visual superior izquierdo, señalando que no se puede establecer una relación directa entre la cantidad de distractores y el TR, como se afirma en estudios previos. Como propuesta para el futuro, en próximos estudios, podría añadirse un punto de fijación central antes de la presentación de cada ensayo para ver si sigue siendo la posición 1 la más favorecida, o si por el contrario los sujetos responden con más rapidez al estímulo central. De la misma manera, muchos son los paradigmas que demuestran que se necesita más tiempo para responder a los estímulos incongruentes. ¿Qué sucedería si los distractores pasarán a ser los estímulos congruentes y los sujetos tuviesen que responder a un estímulo objetivo incongruente? ¿Los tiempos de reacción serían similares a los obtenidos en este estudio o por el contrario serían superiores?

Agradecimientos

A todos los voluntarios, ya que sin su participación generosa el presente trabajo no se hubiese podido llevar a cabo. Además, agradecer la colaboración de la Dra. M^a Teresa Miranda y del Dr. Juan Lupiáñez.

Referencias

1. Estévez-González A, García-Sánchez C, Junqué C: **La atención: una compleja función cerebral.** *Rev Neurol* 1997, 25: 1989-97.
2. Funes MJ, Lupiáñez J: **La teoría atencional de Posner: una tarea para medir las funciones atencionales de Orientación, Alerta y Control Cognitivo y la interacción entre ellas.** *Psicothema* 2003, 15: 260-266.
3. Colmenero JM, Catena A, Fuentes LJ, Marí-Beffa P: **Influencias inhibitorias de la atención en la selección de información visual para la acción.** *Cognitiva* 1995, (7) 1: 113-128.
4. Agis I, Carmona E, Fuentes LJ, Catena A: **Mecanismos inhibitorios de la atención selectiva: una revisión.** *Revista de Psicología General y Aplicada* 1996, 50: 359-370.
5. Colmenero JM, Catena A, Fuentes LJ: **Atención Visual: Una revisión sobre las redes atencionales del cerebro.** *Anales de Psicología* 2001, 17: 45-67.
6. Stroop J: **Studies of interference in serial verbal reactions.** *Journal of Experimental Psychology* 1935, 18: 643-661.
7. Eriksen BA, Eriksen CW: **Effects of noise letters upon the identification of a target letter in a nonsearch task.** *Perception and Psychophysics* 1974, 16: 143-149.
8. Posner MI, Petersen SE: **The attention system of the human brain.** *Annual Review of Neuroscience* 1990, 13: 25-42.
9. Posner MI, Rothbart, MK: **Attentional mechanisms and conscious experience** 1991. En AD Milner y MD Rugg. (Eds.), *The Neuropsychology of consciousness* (pp. 91-112), London: Academic Press.
10. Posner MI, Dehaene S: **Attentional networks.** *Trends in Neuroscience* 1994, 17: 75-79.
11. Chajut E, Schupak A, Algom D: **Are spatial and dimensional attention separate? Evidence from Posner, Stroop, and Eriksen tasks.** *Memory & Cognition* 2009, 37 (6): 924-934.
12. Funes MJ, Lupiáñez J: **El efecto de las señales espaciales sobre el efecto de Stroop Espacial 2007:** En Ortells J.J. (Eds.), *La Atención: Un enfoque pluridisciplinar, Vol III.*
13. Shalev L, Algom D: **Stroop and Garner Effects In and Out of Posner's Beam: Reconciling Two Conceptions of Selective Attention.** *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance* 2000, 26: 997-1017.
14. Posner MI, Snyder CRR, Davidson BJ: **Attention and the detection of signals.** *Journal of Experimental Psychology: General* 1980, 109: 160-174.
15. Adam JJ, Davelaar EJ, Van Der Gouw A, Willems P: **Evidence for attentional processing in spatial localization.** *Psychological Research* 2008, 72: 433-442.
16. Mancebo-Azor R, Sáez-Moreno JA, Domínguez-Hidalgo I, Luna-Del Castillo JD, Rodríguez-Ferrer JM: **Efectos del contraste, excentricidad y posición en la detección de estímulos visuales en humanos.** *Rev Neurol* 2009, 48: 129-133.
17. Ponte D, Sampedro MJ, Pardavila M: **Efecto de la excentricidad en tareas de búsqueda visual que difieren en las demandas atencionales.** *Psicothema* 2004, 16: 563-569.
18. Chen Z, Treisman A: **Distractor inhibition is more effective at a central than at a peripheral location.** *Perception and Psychophysics* 2008, 70: 1081-1091.
19. Whitehead R: **Right hemisphere processing superiority during sustained visual attention.** *Journal of Cognitive Neuroscience* 1991, 3: 329-334.
20. Fuentes LJ, Tudela P: **Semantic processing of foveally and parafoveally presented words in a lexical decision task.** *The Quarterly Journal of Experimental Psychology A: Human Experimental Psychology* 1992, 45A: 299-322.

21. Carrasco M, Ponte D, Rechea C, Sampedro MJ: **“Transient structures” the effects of practice and distractor grouping on within-dimension conjunction searches.** *Perception and Psychophysics* 1998, 60: 1243-1258.
22. Ponte D, Sampedro MJ: **Guía de la atención hacia un elemento definido por una conjunción intradimensión.** *Psicothema* 1997, 9: 377-382.

CAPITULO 9

***Toma de decisiones en adolescentes con exceso de peso: análisis
preliminares***

***E. Delgado-Rico
N. Albein Urios
E. González Jiménez
J. Schmidt
F. Cruz
M. Pérez-García
C. Campoy
A. Verdejo-García***

Toma de decisiones en adolescentes con exceso de peso: análisis preliminares

Elena Delgado-Rico¹, Natalia Albein Urios¹, Emilio González Jiménez², Jacqueline Schmidt², Francisco Cruz¹, Miguel Pérez-García^{1,3}, Cristina Campoy^{3,4} y Antonio Verdejo-García^{1,3}

1, Departamento de Personalidad, Evaluación y Tratamiento Psicológico, Facultad de Psicología. Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, España.

2, Departamento de Enfermería, E. U. Ciencias de la Salud. Avda. de Madrid s/n, 18071 Granada, España.

3, Instituto de Neurociencia F. Olóriz, Facultad de Medicina. Avda. de Madrid 11, 18012 Granada, España.

4, Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina. Avda. de Madrid 11, 18012 Granada, España.

Direcciones de correo electrónico:

EDR: elenadr@ugr.es

NAU: natalia.alur@gmail.com

EGJ: emigoji@correo.ugr.es

JS: jschmidt@ugr.es

FC: fcruz@ugr.es

MPG: mperezg@ugr.es

CC: ccampoy@ugr.es

AVG: averdejo@ugr.es

Resumen

Introducción: Los estudios realizados con adolescentes obesos muestran una relación negativa entre el IMC y el rendimiento neuropsicológico, por ejemplo, en tareas de toma de decisiones (Verdejo et al., 2009). Sin embargo, y a pesar de la creciente evidencia, los estudios sobre el rendimiento neuropsicológico en adolescentes con sobrepeso u obesidad son aún escasos. El objetivo de esta comunicación es explorar la toma de decisiones en adolescentes con sobrepeso u obesidad. **Método:** La muestra se compone de 15 adolescentes con sobrepeso u obesidad (Índice Masa Corporal (IMC)) entre 22,8 – 41,3 kg/m²) y 5 adolescentes con normopeso (IMC < 22,5 kg/m²), de ambos sexos. El intervalo de edad osciló entre los 13 – 16 años. Todos los participantes cumplieron el Inventario de Trastornos de la Conducta Alimentaria (EDI-2) (GARNER D.M. TEA EDICIONES Madrid, 2005) y la Iowa Gambling Task (Bechara y cols., 1994; Adaptación española, Verdejo y cols., 2004). **Resultados:** Los resultados obtenidos corroboran la relación negativa entre el IMC y la toma de decisiones ($r = -0,483$; $p < 0,05$). Además, se

observan correlaciones relevantes entre la toma de decisiones y algunos factores de los trastornos de la conducta alimentaria. Concretamente, se encuentran correlaciones entre la toma de decisiones y el miedo a la madurez ($r = -0,412$), impulsividad ($r = -0,391$) y ascetismo ($r = -0,607$). **Conclusiones:** Los resultados sugieren que el sobrepeso y ciertas características de los trastornos de la conducta alimentaria se relacionan negativamente con el rendimiento neuropsicológico en tareas de toma de decisiones.

Introducción

Las tasas de obesidad en niños y adolescentes han aumentado notablemente en las últimas décadas. Recientes datos epidemiológicos indican un aumento de la prevalencia en la mayor parte de los países del mundo. Según el estudio AVENA, España es el segundo país europeo con mayor número de niños y adolescentes obesos. Los problemas de peso entre los adolescentes españoles se han casi triplicado en los últimos 20 años [1]. Estudios recientes indican que el 26,5% de los niños y adolescentes españoles tiene sobrepeso (12,5%) y obesidad (14%), lo que supone que 1 de cada 4 tiene exceso de peso, dándose las tasas más altas en Andalucía y Canarias [2]. Esto supone un importante y creciente problema de salud, pues tener exceso de peso durante la niñez o adolescencia está asociado con numerosos problemas médicos, psicológicos y psicosociales, tanto en el momento actual como en el futuro. Respecto a los problemas médicos, la mayoría de los estudios indican que existe una mayor probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, y otras enfermedades [3]. Los problemas psicológicos y psicosociales no están tan bien documentados, sin embargo, algunos estudios señalan que los adolescentes con exceso de peso tienen más problemas de conductas y una autoestima más baja que los adolescentes con normopeso. A largo plazo, los problemas de peso pueden propiciar el desarrollo de problemas psicológicos, como por ejemplo, depresión, ansiedad, baja autoestima, mayor agresividad, etc. [4].

Obesidad y Neuropsicología

Desde la neuropsicología, se defiende que la obesidad se produce por una interacción anormal entre los mecanismos cerebrales implicados en la regulación fisiológica de la ingesta y los mecanismos cerebrales implicados en la regulación motivacional de la toma de decisiones. Las investigaciones muestran que cuando se produce un descenso de energía, el

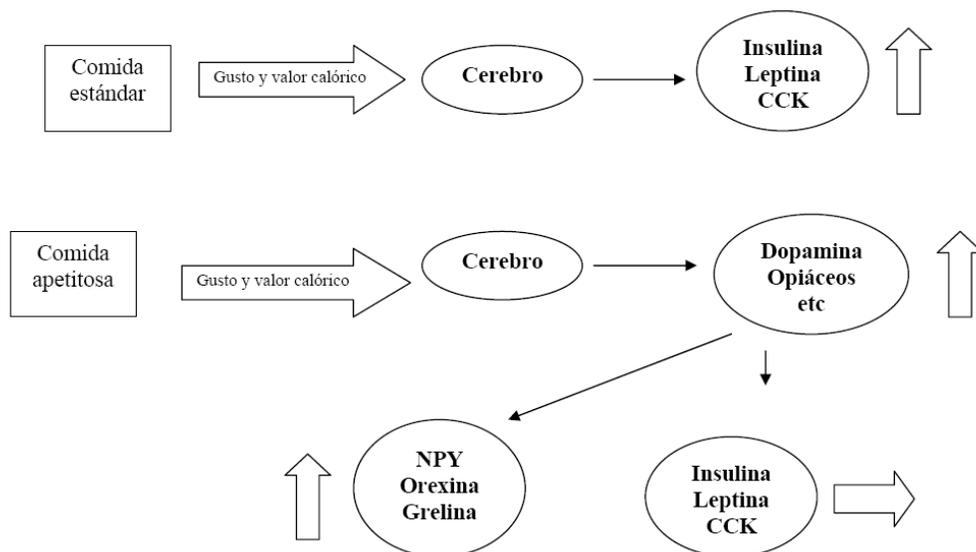


Figura 1. Señales de hambre y saciedad durante la ingesta de comida estándar y apetitosa. *Arriba:* señalización de hambre y saciedad durante la ingesta de comida estándar; *Abajo:* La comida apetitosa produce resistencia a las distintas señales de saciedad (CCK, insulina y leptina) resultando en sobrealimentación. La ingesta queda controlada por un incremento de la actividad del sistema de motivación y recompensa (Dopamina, Serotonina y Opiáceos), disparado por el atractivo del sabor, produciendo hipersensibilización de la motivación hacia la comida.

hipotálamo protagoniza la liberación de señales de hambre y la activación de sus receptores. Si se ingiere comida estándar (nivel calórico y palatabilidad normal) la información sobre el contenido calórico y el sabor viaja al tronco cerebral, y de ahí, se transmite al hipotálamo, permitiendo la liberación o regulación de varios péptidos que generan sensaciones de saciedad, y que propician el cese del consumo de alimentos para mantener el equilibrio homeostático. Sin embargo, si se ingiere comida apetitosa (alto nivel calórico y alto grado de palatabilidad), la información sobre el contenido calórico y el sabor es transmitida al sistema de recompensa, el cual libera y/o regula mediadores de recompensa (dopamina, endocannabinoides y opiáceos) que interfieren sobre las neuronas del hipotálamo que controlan el apetito. Como consecuencia, aumentan las señales de los péptidos que producen las sensaciones de hambre (neuropéptido Y, orexina, etc.) y decaen las señales de los péptidos que producen la saciedad (insulina, leptina, etc.) (ver figura 1). Por tanto, cuando la comida es apetitosa se mantienen las señales de hambre, favoreciendo el consumo de alimentos, no tanto por las necesidades biológicas sino por las recompensas agradables que esto produce [5]. En resumen, podría decirse que el valor hedónico de los alimentos regula la conducta de ingesta, de manera que cuando la comida es de bajo valor hedónico (nivel calórico y palatabilidad normal), dicha conducta es controlada por los mecanismos homeostáticos que regulan el apetito, y cuando la comida es de alto valor hedónico (alto nivel calórico y alto grado de palatabilidad), la conducta pasa a ser controlada por los mecanismos cerebrales implicados en la regulación motivacional de incentivos. En este sentido, se ha propuesto que la obesidad comparte mecanismos psicológicos y neurobiológicos con la adicción, donde las sustancias de consumo desplazan o “secuestran” los mecanismos de decisión adaptativos [3,4]. En este contexto, podemos definir la obesidad como una alteración de los mecanismos de toma de decisiones que permiten dirigir la conducta hacia metas adaptativas. Esta visión se refleja en el modelo del marcador somático.

Toma de decisiones: el modelo del Marcador Somático

El modelo del Marcador Somático propone que la toma de decisiones es un proceso guiado por señales emocionales (marcadores somáticos) que anticipan los resultados prospectivos

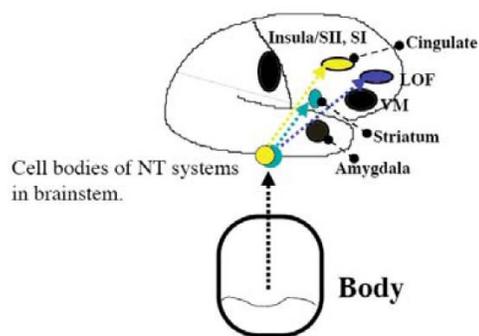


Figura 2. Proyección de las señales corporales (marcadores somáticos) a través de diversas vías de comunicación cuerpo-cerebro (vagal, hormonal, músculo-esquelética).

de distintas opciones de respuesta, marcándolas como positivas o negativas para el organismo de acuerdo con una lógica homeostática [6, 7]. Las señales corporales (marcadores somáticos) proyectan señales ascendentes a través de diversas vías de comunicación cuerpo-cerebro (vagal, hormonal, músculo-esquelética). Los marcadores somáticos son procesados al nivel del tronco cerebral, donde se encuentran los cuerpos celulares de los principales neurotransmisores: Dopamina, Serotonina y Noradrenalina. A través de la acción de estos neurotransmisores, los marcadores somáticos participan en, al menos, dos procesos: (1) consolidar experiencias emocionales al nivel de la ínsula y las cortezas somatosensoriales, y (2) influir sobre los procesos de motivación y decisión, a nivel del cuerpo estriado y las cortezas orbitofrontal y cingulada (ver figura 2) [8]. Desde este modelo, postularíamos que la obesidad está asociada con la alteración de al menos dos mecanismos complementarios: (1) se produce una valoración exagerada del valor motivacional o hedónico de los alimentos

(p.e., basada en su grado de palatabilidad o su nivel calórico), produciendo señales somáticas muy intensas que podrían atenuar la influencia de señales homeostáticas; y (2) se produce un déficit en los mecanismos de control de impulsos y autorregulación que en condiciones normales controlan conductas inapropiadas para las demandas actuales.

Consideraciones psicobiológicas del neurodesarrollo

Durante la adolescencia ocurren importantes cambios anatómicos, funcionales y metabólicos en el cerebro que permiten a los adolescentes ir adquiriendo progresivamente estilos emocionales y cognitivos adultos. En esta etapa, la poda sináptica y otros procesos de desarrollo del córtex prefrontal, concurren con una mayor motivación para buscar e involucrarse en nuevas experiencias, sobre todo, las que tienen que ver con situaciones de recompensa. Sin embargo, el córtex prefrontal aún no ha alcanzado su máximo desarrollo, por lo que las funciones cognitivas que dependen de la maduración de estos circuitos, como por ejemplo, la capacidad para inhibir los impulsos o de autorregular la conducta, aún no han alcanzado su máximo nivel. En resumen, podría decirse que la mayor motivación para participar en nuevas actividades proporciona experiencias que facilitan la maduración de la corteza prefrontal, pero al mismo tiempo, suponen un periodo de vulnerabilidad hacia cierto tipo de comportamiento, pues la relativa inmadurez del sistema de control del córtex prefrontal, acompañado por una relativa madurez del sistema estriado, responsable de los procesos de recompensa y motivación, hacen que durante la adolescencia la actividad del sistema de recompensa prevalezca sobre la del sistema que regula la evitación o el autocontrol [9].

Teniendo en cuenta todo lo mencionado en párrafos anteriores, los objetivos de este trabajo son: (1) examinar el rendimiento neuropsicológico en toma de decisiones de adolescentes con sobrepeso u obesidad, y (2) explorar su asociación con factores psicológicos relacionados con trastornos de la conducta alimentaria.

Métodos

Participantes

La muestra estuvo compuesta por un total de 20 adolescentes de ambos sexos (12 chicas y 10 chicos), 15 con exceso de peso (IMC entre 22,8 – 41,3 kg/m²) y 5 con normopeso (IMC < 22,5 kg/m²), pertenecientes a 12 centros educativos de Granada (capital). El intervalo de edad osciló entre los 13 – 16 años. Todos ellos, firmaron un consentimiento informado antes de participar en el estudio.

Instrumentos y procedimiento

Inventario de Trastornos de la Conducta Alimentaria [10]

Es un autoinforme que evalúa actitudes y rasgos psicológicos relevantes para realizar un screening de los trastornos de la conducta alimentaria. Consta de 91 ítems: 64 puntúan en 8 escalas principales (obsesión por la delgadez, bulimia, insatisfacción corporal, ineficacia, perfeccionismo, desconfianza interpersonal, conciencia interoceptiva, miedo a la madurez) y 27 en otras 3 (ascetismo, impulsividad e inseguridad social). La escala de respuesta es de 6 puntos (nunca/siempre), pero se corrigen de 3-2-1-0-0-0, por motivos teóricos. Hay ítems positivos y negativos, por lo que los puntos se atribuyen en función de la redacción.

Iowa Gambling Task [11]

Es una tarea de ordenador que evalúa la toma de decisiones. En la pantalla aparecen 4 mazos de cartas (ver figura 3). El participante debe ir eligiendo cartas de los cuatro mazos hasta realizar 100 elecciones. Con cada carta, el participante puede ganar, o ganar y perder dinero, después de cada elección se le proporciona un feedback. El objetivo es conseguir el mayor dinero posible.

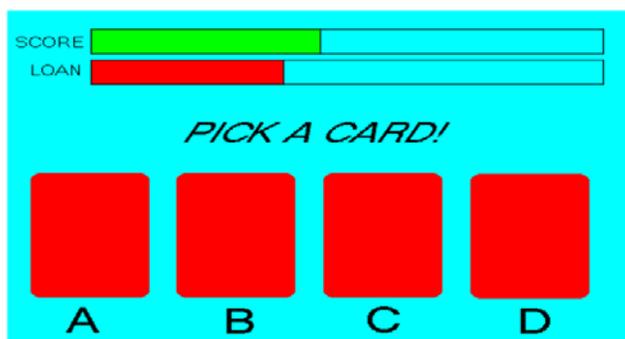
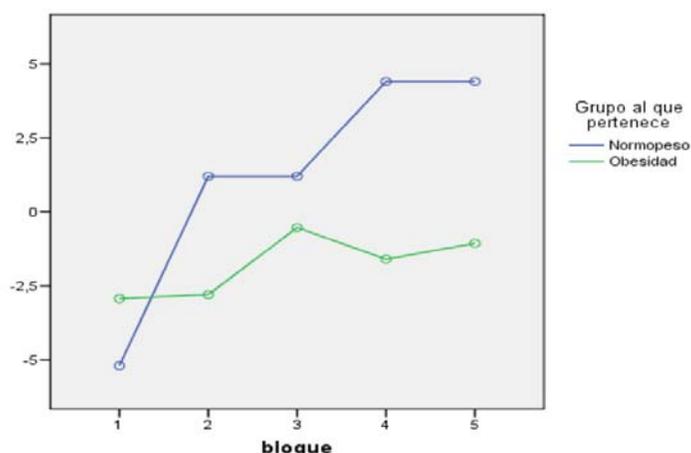


Figura 3. Iowa Gambling Task

Los mazos A y B, son mazos "arriesgados", pues proporcionan alta recompensa inmediata pero un alto castigo demorado, y los mazos C y D, son mazos "seguros", proporcionan baja recompensa inmediata pero tienen un mínimo castigo demorado. La puntuación final se obtiene sumando las elecciones seguras y restándole la suma de las elecciones arriesgadas [(C+D)-(A+B)]. El resultado es una curva de aprendizaje de cinco puntos, pues las 100 elecciones se dividen en 5 bloques de 20 ensayos.



Gráfica 1. IMC y rendimiento en tarea de toma de decisiones

El participante debe ir eligiendo cartas de los cuatro mazos hasta realizar 100 elecciones. Con cada carta, el participante puede ganar, o ganar y perder dinero, después de cada elección se le proporciona un feedback. El objetivo es conseguir el mayor dinero posible. Los mazos A y B, son mazos "arriesgados", pues proporcionan alta recompensa inmediata pero un alto castigo demorado, y los mazos C y D, son mazos "seguros", proporcionan baja recompensa inmediata pero tienen un mínimo castigo demorado. La puntuación final se obtiene sumando las elecciones seguras y restándole la suma de las elecciones arriesgadas [(C+D)-(A+B)]. El resultado es una curva de aprendizaje de cinco puntos, pues las 100 elecciones se dividen en 5 bloques de 20 ensayos.

Todos los participantes, tras firmar el consentimiento informado, llevaron a cabo ambas tareas.

Análisis de datos

Se llevaron a cabo correlaciones entre las diferentes variables usando el programa estadístico SPSS versión 15.1.

Resultados

Los resultados mostraron la existencia de una correlación negativa entre el IMC y el rendimiento la tarea de toma de decisiones ($r = -0,483$; $p < 0,05$). Como puede observarse en la gráfica 1, los adolescentes con normopeso tienen mejor rendimiento que los que tienen exceso de peso, los cuales, obtienen puntuaciones inferiores a 0 y la curva de aprendizaje a lo largo de la tarea es prácticamente plana. Además, se observan correlaciones significativas entre el rendimiento en toma de decisiones y las puntuaciones de diversos factores relacionados con trastornos de la conducta alimentaria. Concretamente, se encuentran correlaciones entre la toma de decisiones y "miedo a la madurez" ($r = -0,412$), "impulsividad" ($r = -0,391$) y "ascetismo" ($r = -0,607$).

Discusión

La relación negativa entre el IMC y el rendimiento en tareas de toma de decisiones corrobora los datos encontrados en estudios anteriores [13,14]. Esto puede ser explicado teniendo en cuenta el modelo del Marcador Somático. Como se explicó anteriormente, es posible que los adolescentes con exceso de peso generen señales somáticas más intensas ante situaciones de recompensa inmediata. Dichas señales podrían interferir en el proceso de toma de decisiones, sobrestimando el valor la recompensa y produciendo déficit en los mecanismos de que controlan los impulsos o autorregulan la conducta. Este modelo, también podría explicar la relación negativa entre la impulsividad y el rendimiento en la tarea de toma de decisiones.

Por otra parte, la relación negativa entre el miedo a la madurez y la toma de decisiones podría ser explicada atendiendo a los procesos de neurodesarrollo que están ocurriendo en esta etapa. Aquellos adolescentes que se encuentran en un nivel de maduración superior respecto a los otros, tomarían decisiones más adaptativas y tendrían menos miedo a la madurez. Por último, el ascetismo hace referencia a una actitud de autodisciplina y autocastigo, mediante la cual se intenta alcanzar los objetivos de acuerdo a normas internas. Por tanto, obtener puntuaciones altas en esta variable indicaría cierto grado de rigidez mental. Nuevamente, la relación negativa encontrada entre el ascetismo y el rendimiento en la tarea de toma de decisiones podría ser explicada desde el modelo del Marcador Somático, ya que, los adolescentes que alcanzan puntuaciones elevadas en esta variable, tomarían sus decisiones de acuerdo a sus normas internas, y no tendrían tan en cuenta las señales somáticas que podrían guiar dicho proceso hacia un resultado más adaptativo.

Limitaciones

Este estudio cuenta con una importante limitación muestral. A pesar de que los datos encontrados pueden ser interpretados de acuerdo a los modelos teóricos propuestos, y algunos de los datos encontrados confirman los resultados hallados en estudios anteriores, se necesita un mayor tamaño muestral para poder tener datos más concluyentes.

Conclusiones

Según los datos encontrado, y teniendo en cuenta las limitaciones de este estudio, se podría concluir que el exceso de peso se relaciona negativamente con el rendimiento en tarea de toma de decisiones, y que ciertas características de los trastornos de la conducta alimentaria, como son: el *Miedo a la madurez*, la *Impulsividad* y el *Ascetismo* se relacionan negativamente con el rendimiento en tareas de toma de decisiones.

Competición de intereses

Los autores declaran no tener intereses opuestos.

Contribución de los autores

EDR: reclutamiento de la muestra, recogida y procesamiento de datos neuropsicológicos y redacción del manuscrito. NAU: participó en el reclutamiento de la muestra y la recogida y procesamiento de datos neuropsicológicos. EGJ y JS: recogida y procesamiento de datos físicos, además, JS participó en el diseño del estudio. FC, MPG y CC: participaron en diseño del estudio. AVG: diseño del estudio, análisis estadísticos, supervisión del estudio y revisión del manuscrito.

Agradecimientos

Este estudio forma parte de un proyecto financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. Proyecto de la Consejería de Salud PI 0416/2008, "*Mecanismos Cerebrales y Tratamiento de la Obesidad en Adolescentes (BRAINOBE)*".

Referencias

1. Estudio AVENA (Alimentación y Valoración del Estado Nutricional en Adolescentes). 2003 – 2006.
2. Serra L, Ribas L, Aranceta J, Pérez C, Saavedra P, y Peña Q: **Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998-2000)**. *Med Clin (Barc)* 2003, 121(19):725-32
3. Volkow ND, y O'Brien CP: **Issues for DSM-V: should obesity be included as a brain disorder?** *Am J Psychiatry* 2007, 164:708-710.
4. Acosta MC, Manubay J, y Levin FR: **Pediatric obesity: parallels with addiction and treatment recommendations**. *Harv Rev Psychiatry* 2008, 16:80-96.
5. Finlayson G, King N, y Blundell JE: **Liking vs. wanting food: importance for human appetite control and weight regulation**. *Neurosci Biobehav Rev* 2007, 31: 987-1002
6. Paulus MP: **Decision-making dysfunctions in psychiatry--altered homeostatic processing?** *Science* 2007, 318:602-606.
7. Verdejo-García A, y Bechara A: **A somatic-marker theory of addiction**. *Neuropharmacology* 2009, 56:48-62.
8. Verdejo-García A, Pérez-García M, y Bechara A: **Emotion, decisión-making and substance dependence: A somatic-marker model of addiction**. *Curr Neuropharmacology* 2006, 4:17-31.
9. Chambers RA, Taylor JR, y Potenza MN: **Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability**. *Am J Psychiatry* 2003, 160:1041-1052.
10. Garner DM: **EDI II. INVENTARIO DE TRASTORNOS DE LA CONDUCTA ALIMENTARIA**. TEA EDICIONES 2005, Madrid.
11. Bechara A, Damasio AR, Damasio H, y Anderson SW: **Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex**. *Cognition* 1994, 50:7-15.
12. Verdejo-García A, Pérez-Expósito M, Schmidt Río-Valle J, Fernández-Serrano MJ, Cruz F, Pérez-García M, López-Belmonte G, Martín-Matillas M, Martín-Lagos JA, Marcos A, y Campoy C: **Decision-making deficits and overeating: a risk model for obesity**. *Obesity* 2010, (en prensa)
13. Davis C, Levitan RD, Muglia P, Bewell C, Kennedy JL: *Obes Res* 2004, 12: 929-935.

CAPITULO 10

PKM ζ y el mantenimiento de la memoria a largo plazo

***F. Gámiz
M. Gallo***

PKM ζ y el mantenimiento de la memoria a largo plazo

Fernando Gámiz y Milagros Gallo.

Department of Experimental Psychology and Physiology of Behavior. Institute of Neurosciences F. Oloriz., Center for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada, Spain

Autor para correspondencia:

Fernando Gámiz, Institute of Neurosciences F. Oloriz, University of Granada, Avda. del Conocimiento, s/n, Campus de la Salud, 18100- Armilla. Granada. Spain.

Dirección de correo electrónico:

FG: fernandogamiz@ugr.es

Resumen

Introducción.- En el último siglo se han realizado importantes avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de las primeras fases de adquisición de los recuerdos. Sin embargo, existe un gran desconocimiento sobre los mecanismos implicados en el mantenimiento de la memoria. En los últimos cinco años se ha propuesto la actividad automantenida de PKM ζ como sustrato del mantenimiento de la memoria consolidada. **Resultados.-** El capítulo revisa los resultados de los trabajos publicados en los últimos cuatro años en los que se induce la inactivación de PKM ζ mediante administración i.c. del péptido inhibidor ZIP en el Hipocampo, Amígdala y Corteza Insular. En conjunto, los datos indican un efecto amnésico horas, días e incluso meses después de la adquisición en una variedad de tareas (memoria espacial, miedo condicionado, respuestas condicionadas de evitación activa y pasiva, aversiones gustativas condicionadas) en función del área cerebral inyectada. Por otra parte, la administración inmediata o en los siguientes minutos a la adquisición puede interferir con el procesamiento de situaciones novedosas o estresantes, abriendo la posibilidad de nuevas funciones de PKM ζ relacionadas con la memoria a corto plazo. **Conclusiones.-** La participación de PKM ζ en el mantenimiento de una gran variedad de recuerdos a largo plazo, que dependen de circuitos neurales disociables, abre nuevas posibilidades para avanzar en el conocimiento de la compleja organización anatómico-funcional que sustenta la memoria. En conjunto, los resultados obtenidos son coherentes con los planteamientos vigentes en la actualidad, ya que las estructuras cerebrales abordadas que han podido relacionarse con el efecto amnésico han sido relacionadas previamente con la adquisición de los diferentes tipos de memoria estudiadas. Sin embargo, la interpretación de los resultados y de su posible relevancia para la aplicación clínica debe ser extremadamente cautelosa.

Introducción

Cómo se crean los recuerdos y cómo se mantienen durante largos periodos de tiempo son cuestiones a las que la humanidad está tratando de responder desde la antigüedad. Aunque las civilizaciones egipcia, griega y romana sugirieron respuestas más o menos acertadas, los planteamientos actuales se han beneficiado de los logros obtenidos en el campo de las Neurociencias durante el último siglo. Los retos actuales a la hora de desentrañar la naturaleza de los recuerdos pueden agruparse en torno a dos aspectos: su contenido y su duración.

Con respecto al primer aspecto, una vez superados los debates entre localizacionistas y holistas, hoy en día está ampliamente aceptado que existen diversos tipos de memoria disociables que dependen de una compleja organización de circuitos neurales situados en distintos niveles de organización cerebral. Desde el descubrimiento de la existencia de capacidades de memoria preservadas en pacientes amnésicos con daño del lóbulo temporal medial (Milner, 1965), han predominado las propuestas teóricas dicotómicas que distinguen entre memoria declarativa/explicita versus memorias no declarativas/implícitas (Squire, 2009). La memoria declarativa, que incluye memoria semántica (conocimiento general) y episódica (autobiográfica) depende del lóbulo temporal medial y de sus proyecciones corticales, especialmente con la corteza prefrontal. Este tipo de memoria se describe como el recuerdo consciente al que llamamos *memoria* en seres humanos y muestra características, tales como la dependencia del contexto, rapidez de adquisición, flexibilidad y complejidad representacional, que permiten su estudio en modelos animales. En roedores las tareas más empleadas para estudiar memoria declarativa incluyen el reconocimiento de objetos novedosos con ensayo único y la navegación en laberintos siempre y cuando se base en representaciones complejas y flexibles del contexto, siendo la búsqueda de una plataforma oculta en el laberinto acuático la más empleada. Por su parte, las memorias no declarativas se definen por defecto como todas aquellas que no cumplen las condiciones mencionadas para la memoria declarativa, lo que en términos concretos suele suponer todas las que permanecen preservadas después del daño hipocámpal. El término memoria no declarativa incluye, por tanto, una diversidad de recuerdos, no necesariamente conscientes, adquiridos gracias a las capacidades plásticas de los sistemas sensoriales, motores y emocionales, que se ponen de manifiesto, de manera más automática, cuando las situaciones lo requieren. En roedores se emplean tareas de aprendizaje asociativo (miedo condicionado, evitación activa y pasiva, condicionamiento aversivo gustativo, condicionamiento palpebral, etc...) y no-asociativo (habitación, sensibilización) para investigar estos tipos de memorias. Los resultados de intervenciones cerebrales han mostrado que se trata de recuerdos que dependen de una diversidad de circuitos neurales disociables y que exhiben características diferentes entre sí, lo que está poniendo en tela de juicio el valor de las propuestas radicalmente dicotómicas. Ello, sumado a los datos que demuestran la interacción entre sistemas (Poldrack and Packard, 2003) ha conducido a propuestas alternativas (McDonald et al., 2004; Mizumori et al., 2004) que enfatizan la necesidad de abordar un nivel de integración superior a los planteamientos relativamente simplistas actuales para la comprensión de los sistemas de memoria.

Con respecto al segundo aspecto, desde que los trabajos de Müller y Pilzecker en 1900 y las propuestas de Donald Hebb (1949) dieron lugar a la teoría de la consolidación (McGaugh, 2000), se acepta que, en función de su duración, un recuerdo puede encontrarse en diversas fases de estabilización. Sin entrar en el debate sobre si estas fases se organizan de manera secuencial o en paralelo, puede distinguirse entre memoria inmediata, que se

relaciona con el concepto actual de memoria de trabajo, memoria a corto plazo, con una duración de minutos a horas y memoria a largo plazo que puede durar días, semanas, meses o incluso una vida entera. La teoría de la consolidación, que implica el paso del recuerdo permanente de una fase lábil a una estable no afectada por tratamientos tales como estimulación electroconvulsiva o inhibición de la síntesis de proteínas, por ejemplo, permite explicar la amnesia retrógrada en pacientes con daño del sistema temporal que afecta a recuerdos no consolidados. Esta teoría está siendo enriquecida en la actualidad por datos que indican la maleabilidad de los recuerdos incluso una vez establecidos. En este sentido se incluyen procesos de reconsolidación por los cuales los recuerdos previamente consolidados se desestabilizan parcialmente y se actualizan, integrando nueva información cuando son recuperados (Dudai, 2006; Rodríguez-Ortiz and Bermúdez-Rattoni, 2007; Sara, 2000).

Grandes avances se han realizado en las últimas décadas en la identificación de los mecanismos celulares y moleculares responsables de la memoria gracias a fructíferas líneas de investigación en invertebrados, como la de Erick Kandel en la *Aplysia* por la que recibió el Premio Nobel en 2000 (Kandel, 2000, 2001) y gracias al descubrimiento por parte de Bliss y Lomo (1973) de la potenciación a largo plazo (LTP) en rodajas hipocampales como modelo de plasticidad sináptica (Cooke and Bliss, 2006; Lomo, 2003), hallazgo al que han seguido otros fenómenos plásticos tales como depresión a largo plazo y metaplasticidad. De acuerdo con la teoría de la huella dual de Donald Hebb, que describe una primera fase lábil basada en la actividad neural reverberante, la actividad neuronal mantiene la memoria a corto plazo gracias a cascadas de transducción mediadas por quinasas. Dichas señales cuando son transportadas al núcleo activan procesos de regulación génica que conducen a la síntesis de proteínas y a los cambios plásticos responsables de la alteración duradera en la eficacia sináptica que se propone como subyacente a la memoria a largo plazo. Aunque es objeto de debate, existen datos que apoyan la existencia de mecanismos moleculares compartidos para los procesos de consolidación y reconsolidación (Rodríguez-Ortiz and Bermúdez-Rattoni, 2007).

Dado el gran progreso en los conocimientos sobre los acontecimientos celulares e intracelulares implicados en los cambios responsables de la adquisición y primeras fases de consolidación de los recuerdos, los retos actuales están centrados en dilucidar los mecanismos moleculares implicados en los procesos que median la persistencia, extinción y reconsolidación de los recuerdos. Así, en el año 2006, se ha propuesto un mecanismo molecular responsable del mantenimiento de los recuerdos consolidados. Todd Sacktor y su equipo defienden la importancia funcional de una isoforma atípica de PKC con actividad automantenida (Sacktor et al., 1993). Esta proteína, llamada PKM ζ (proteína quinasa M zeta), al carecer de dominio regulador mantiene su actividad de manera persistente. Resultados aplicando inyecciones intrahipocampales del péptido inhibidor de la proteína quinasa Mzeta (ZIP) han demostrado que PKM ζ es necesaria para el mantenimiento, pero no para la inducción, de LTP (Ling et al., 2002; Pastalkova et al., 2006; Serrano et al., 2005). Todo parece indicar que PKM ζ actúa, principalmente, potenciando la transmisión sináptica mediada por los receptores AMPA, modificaciones indispensables para el mantenimiento de LTP (Ling et al., 2002). Otros hallazgos recientes indican que el mantenimiento de LTP por PKM ζ se debe a la regulación del flujo de GluR2 en los receptores AMPA postsinápticos, ya que se ha demostrado que el bloqueo de PKM ζ correlaciona con el descenso de GluR2 postsináptico (Migues et al., 2010).

El hecho de que la inyección bilateral en el hipocampo dorsal del péptido inhibitorio seudosubtrato ζ (ZIP), que actúa como dominio autorregulador e inactiva a PKM ζ (Hernandez et al., 2003; Ling et al., 2002; Ling et al., 2006; Pastalkova et al., 2006; Serrano et al., 2005;

Sacktor, 2008), elimine el recuerdo adquirido 24 horas antes en una tarea de evitación espacial abrió la posibilidad de que la persistente actividad automantenida de la proteína quinasa Mzeta (PKM ζ) pueda representar el fundamento molecular de la memoria a largo plazo (Pastalkova et al., 2006).

Sin embargo, la exploración del papel de PKM ζ en el mantenimiento de los recuerdos exige una amplia investigación en el nivel de análisis de sistemas. Efectivamente, tal y como señalan voces reconocidas en el tema (Cahill et al., 2001), sólo una aproximación que enfrente la complejidad de las interacciones entre las áreas y circuitos cerebrales implicados en los distintos tipos de memoria puede dar sentido a los resultados obtenidos en el nivel celular y molecular. Independientemente de los circuitos cerebrales específicos implicados en la adquisición de cada tipo de memoria, los recuerdos dependen de diversas áreas cerebrales en función de la fase en que se encuentran durante el proceso de consolidación. Determinadas áreas cerebrales, tales como el Hipocampo y la Amígdala, parecen jugar un papel importante en los procesos de consolidación de la memoria declarativa y no declarativa respectivamente. Como consecuencia de dichos procesos los recuerdos pueden estabilizarse en áreas diferentes de aquellas en que se formaron, lo que se ha denominado migración del engrama.

Tabla 1. Efecto de la administración i.c. de ZIP en el mantenimiento de la memoria
Resumen esquemático de los efectos amnésicos de la inyección i.c. de ZIP en roedores en función del área cerebral y del tipo de tarea comportamental.

TAREA ZIP	EVITACIÓN ACTIVA DE LUGAR	LABERINTO RADIAL	LABERINTO ACUÁTICO	MIEDO COND.	EVITACIÓN PASIVA	COND. AVERSIVO GUSTATIVO
HIPOCAMPO	??	?	?	=		=
AMÍGDALA				?	?	
CORTEZA INSULAR						??
TAREA ZIP	RECUERDO TRAUMÁTICO (laberinto elevado, respuesta de sobresalto y petrificación contextual)	COND. PALPEBRAL DE DEMORA	RECONOCIMIENTO DE OBJETOS OBJETOS LUGAR	FAMILIARIZACIÓN AL CONTEXTO		
HIPOCAMPO	?	?	= ??	!		
AMÍGDALA	=					
CORTEZA INSULAR	?					

?? = Eliminación total del recuerdo
 ? = Deterioro parcial del recuerdo o de una característica específica
 ! = Mejora en la tarea
 = = Ningún efecto registrado

A continuación se revisan los datos disponibles hasta la actualidad con respecto al efecto de la administración intracerebral de ZIP en diversas áreas cerebrales sobre el

mantenimiento de diversos tipos de memoria. La tabla 1 presenta un resumen de dichos efectos.

Efecto de la inhibición de la actividad de PKMζ en los circuitos cerebrales responsables de la memoria.

Efecto de la inyección bilateral de ZIP en el Hipocampo Dorsal.

De manera coherente con el papel propuesto para el Hipocampo en el sistema de memoria declarativa, así como su función en los procesos de consolidación, es, con diferencia, la estructura que más estudios sobre la relación entre la actividad de PKMζ y memoria ha generado. Todos ellos han aplicado intervenciones similares en roedores inyectando bilateralmente ZIP (10 nmol/1μl de salino) en el Hipocampo Dorsal (HCD).

En 2006 se publicó en Science el primer estudio que vincula la inhibición de PKMζ con el deterioro de la memoria espacial en una tarea de evitación compleja en ratas (Pastalkova et al., 2006). Los autores eliminaron en el mismo estudio LTP inducida in vivo por estimulación de alta frecuencia y memoria espacial en ratas. Dado que la intervención se retrasó 22 horas, se trataba de modificaciones plásticas consolidadas. Los resultados permiten excluir un efecto inespecífico sobre la actividad neural, ya que no altera la transmisión sino ha sido previamente potenciada. La eliminación del recuerdo adquirido en la tarea de aprendizaje es consistente con la relevancia del Hipocampo en el tipo de memoria que involucra representaciones complejas del entorno. La tarea exigía que el animal aprendiera a evitar una ligera descarga en las patas asociada con un sector fijo en relación con el contexto de la habitación en una arena que giraba constantemente. Ello inducía una respuesta de evitación activa por parte del sujeto que debía depender de las señales contextuales. Se trata de un efecto selectivo sobre la memoria a largo plazo que no se produce al inyectar otros inhibidores de PKC, como la stauroporina, que interfieren selectivamente con la inducción de LTP pero no con su mantenimiento. Por otro lado, parece producir selectivamente la eliminación del recuerdo consolidado sin dañar el mecanismo de consolidación, ya que la capacidad de adquirir nuevos recuerdos no resultó afectada si las mismas ratas eran entrenadas de nuevo.

El mismo grupo ha informado de resultados similares empleando otras tareas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto radial y la piscina de Morris (Serrano et al., 2008). En ambos casos los datos han permitido disociar los efectos de la inactivación de PKMζ en distintos tipos de memoria, confirmando un deterioro selectivo de la memoria de referencia a largo plazo sin que resulte afectada la memoria de trabajo. Así, en el laberinto radial de 8 brazos que contiene un pellet de alimento en cuatro de ellos, lo que se interrumpe es el recuerdo de cuales son los brazos con comida, pero no la memoria de los brazos que ya se han visitado en cada ensayo. Del mismo modo otros tipos de memoria no declarativa, tal como los aspectos procedimentales de la tarea no resultan afectados.

El papel de PKMζ en el hipocampo dorsal también ha sido evaluado utilizando otras tareas de memoria dependientes del hipocampo, tales como reconocimiento de la localización de los objetos (Hardt et al., 2009), condicionamiento palpebral de huella (Madroñal et al., 2010) y miedo al contexto (Serrano et al., 2008). En el primer caso la administración intrahipocámpal de ZIP 1 y 6 días tras la adquisición eliminó el recuerdo de la posición del objeto, sin afectar al recuerdo del objeto (Hardt et al., 2009). En el segundo caso, el grupo que recibió la inyección de ZIP 22 horas después del entrenamiento, en comparación con el grupo inyectado con la versión inactiva scrambled-ZIP, mostró un significativo

descenso tanto de las respuestas condicionadas de parpadeo como de los potenciales postsinápticos excitatorios en CA3 y CA1 durante el intervalo entre el tono (EC) y la estimulación por pulso eléctrico de las colaterales de Schaffer (EI). Por el contrario, el miedo al contexto adquirido al establecer una asociación entre descarga en la patas y un sonido dentro de un contexto determinado, que se pone de manifiesto cuando el animal permanece *petrificado*, no resulta afectado por la inhibición de PKM ζ en el HCd.

Por último, dado que diversas teorías han relacionado la función hipocampal con la detección y respuesta ante la novedad, Moncada y Viola (2008), han explorado el papel de la actividad de la PKM ζ hipocampal en la familiaridad espacial. Partiendo del hecho de que los niveles de PKM ζ hipocampal descendían tras aplicar un protocolo de familiarización a un contexto de campo abierto, los autores utilizaron la infusión de ZIP en el HCd para hacer descender los niveles de PKM ζ de manera artificial y evaluar su efecto sobre la conducta exploratoria. Así comprobaron que la inhibición de este péptido inducía familiaridad espacial, y por lo tanto una menor exploración del contexto, a diferencia del grupo inyectado con scrambled-ZIP. Sin embargo, en este caso la administración de ZIP se aplicaba sólo 1 hora después de la exposición al contexto, lo que permite vislumbrar la participación de PKM ζ en otros procesos además del mantenimiento de la memoria del contexto a largo plazo.

Efecto de la inyección bilateral de ZIP en la Amígdala Basolateral.

Con respecto a la adquisición y mantenimiento de recuerdos emocionales, especialmente asociados a situaciones aversivas y al miedo, la Amígdala parece jugar un papel crucial. La Amígdala basolateral (AMbl), posiblemente por representar la vía de salida del complejo amigdalino y por sus amplias proyecciones sobre los circuitos de memoria, ha sido el objetivo de los experimentos dirigidos a explorar el efecto de la inactivación de PKM ζ mediante inyecciones bilaterales de ZIP.

Los primeros datos utilizando una tarea de miedo condicionado (Serrano et al., 2008) muestran que la inyección de ZIP en la AMbl, 24 horas después de que se forme la asociación entre contexto/tono y descarga, atenúan la respuesta condicionada de petrificación tanto ante el contexto como ante el tono, sin que interfiera con la respuesta incondicionada de miedo producida la descarga. Se trata de la misma intervención que no produjo efecto sobre el miedo aprendido cuando se aplicó en el HCd.

En un estudio del grupo de Helmstetter se obtuvieron conclusiones similares (Kwapis et al., 2009). La inhibición de PKM ζ en la AMbl, pero no en el HCd, deteriora la memoria de miedo al contexto y a un tono condicionado dos días antes.

Asimismo, la inyección bilateral de ZIP en la AMbl 24 horas después del entrenamiento en una tarea de aprendizaje de evitación pasiva, en la que se asocia una descarga con la entrada en un compartimento oscuro, deteriora el recuerdo en una prueba posterior. En nuestro laboratorio hemos obtenido resultados similares empleando una tarea de evitación activa. En ambos casos se trata de una atenuación en vez de la eliminación del recuerdo.

Efecto de la inyección bilateral de ZIP en la Corteza Insular.

La corteza insular (CI), especialmente la corteza gustativa insular, ha sido objeto de interés en relación con el papel de PKM ζ en el mantenimiento de la memoria gustativa. El grupo de Yadin Dudai fue el primero en estudiar el papel de PKM ζ en el mantenimiento de aversiones adquiridas a sabores cuya ingestión fue seguida de malestar gastrointestinal en ratas (Shema et al., 2007). Este tipo de asociación produce en un sólo ensayo intensas

aversiones condicionadas difíciles de extinguir que dependen de un circuito neural independiente del hipocampo. Los resultados de Shema et al., publicados en Science en 2007, resultaron especialmente sorprendentes ya que la inhibición de PKM ζ mediante la inyección bilateral de ZIP en la CI, 3, 7 y hasta 25 días después del entrenamiento borraba por completo la aversión, sin dejar rastro alguno que pudiera detectarse con pruebas de recuperación espontánea o reactivación del recuerdo. La intervención parece eliminar selectivamente el recuerdo aversivo sin impedir la adquisición de nuevas aversiones. Los resultados han sido replicados posteriormente (Shema et al., 2009) ampliando el periodo de consolidación previo a la inyección a 3 meses, ya que algunos autores han indicado que el proceso de consolidación en ratas puede durar un mes en ocasiones (Anagnostaras et al., 1999; Bontempi et al., 1999). Aún más, la inyección de ZIP en la CI eliminó aversiones condicionadas previamente a dos sabores distintos e incluso cuando se incrementa el número de ensayos de condicionamiento hasta tres (Shema et al., 2007; 2009).

De acuerdo con los resultados obtenidos con tareas hipocampales, parece tratarse de un efecto específico sobre la memoria a largo plazo, ya que el recuerdo no resultaba alterado si la inyección de ZIP se aplicaba dos horas antes de la presentación del sabor, durante el intervalo entre el sabor y el malestar, o una hora tras la asociación sabor-malestar. Estos datos implican que el bloqueo de PKM ζ en la CI no afecta a la memoria a corto plazo del sabor y posiblemente tampoco a la codificación del malestar. Parece únicamente afectar al mantenimiento del recuerdo consolidado (Shema et al., 2007; 2009).

La huella itinerante de un recuerdo traumático.

La relevancia de la actividad de PKM ζ en la CI para el mantenimiento de recuerdos aversivos es coherente con otros resultados obtenidos en el trabajo de Cohen et al. (2010). En su estudio utilizaron un modelo animal del trastorno por estrés postraumático, en el que las ratas eran expuestas al olor de la cama de un depredador, lo que inducía un incremento posterior de las respuestas de ansiedad, detectable en la ejecución de un laberinto elevado, el reflejo de sobresalto y petrificación contextual. Comprobaron que si se inyectaba ZIP en la CI 10 días tras la exposición estresante la respuesta de ansiedad descendía a niveles basales, a diferencia del grupo que recibió la versión inactiva de ZIP o bien ZIP en el HCd, el ventrículo lateral (VL) y AMbl. Sin embargo cuando la microinfusión de ZIP se realizaba inmediatamente después del estímulo ansiógeno únicamente se eliminaba el recuerdo estresante si era inyectado en el VL o en el HCd, pero no en la CI ni en AMbl. Los autores interpretan que los recuerdos traumáticos están localizados en diferentes áreas cerebrales en función del grado de consolidación, lo que es coherente con los conocimientos existentes. Los resultados parecen indicar que los procesos de consolidación dependerían del sistema hipocampal mientras que a largo plazo los recuerdos serían almacenados en la CI.

Por otra parte, el trabajo aporta información acerca del posible efecto reforzante de la situación estresante sobre recuerdos aversivos anteriores. Así, el recuerdo de una aversión gustativa adquirida 48 horas antes del inicio de la exposición estresante no resultó afectado por la inyección de ZIP en la CI, a pesar de interferir con el recuerdo traumático. La disparidad con los resultados previamente mencionados del grupo de Dudai en ausencia de estimulación traumática (Shema et al., 2007; 2009) pone de manifiesto la complejidad de las interacciones entre diversos tipos de memoria.

Discusión

Los hallazgos revisados en torno a la participación de PKM ζ en el mantenimiento de una gran variedad de recuerdos a largo plazo abren nuevas e interesantes posibilidades para avanzar en el conocimiento de la compleja organización anatómico-funcional que sustenta la memoria.

Buena parte de los resultados obtenidos son coherentes con los planteamientos vigentes en el área en la actualidad. Así, la actividad de la enzima en diversas estructuras cerebrales resulta selectivamente implicada en los diferentes tipos de memoria con los que han sido relacionadas previamente.

Efectivamente, la inactivación de PKM ζ en el Hcd interfiere con la memoria a largo plazo del contexto necesaria para la navegación espacial (Pastalkova et al., 2006) y el reconocimiento de la localización de los objetos (Hardt et al., 2009), así como con el condicionamiento palpebral de demora (Madroñal et al., 2010). A pesar de que el miedo al contexto, cuya adquisición ha resultado sensible a lesiones hipocampales en trabajos previos, no parezca resultar afectado por la inyección de ZIP en el Hcd (Serrano et al., 2008), ello no permite excluir la participación hipocampal, debido a que el Hipocampo ventral no ha sido explorado. Asimismo, los resultados obtenidos con la inactivación de PKM ζ en la AMbl confirman su participación en los recuerdos emocionales adquiridos en tareas de miedo condicionado y evitación. Por último, el hecho de que la inyección bilateral de ZIP en la CI elimine las aversiones gustativas condicionadas aporta un contundente apoyo a planteamientos ya existentes, en función de datos anteriores, que defendían un papel crucial de la zona en la memoria gustativa a largo plazo.

En conjunto los datos apoyan versiones actuales de la teoría de la consolidación por la que los cambios moleculares que conducen a la estabilización de la memoria se producen en circuitos neuronales diversos, pudiendo añadirse otras áreas, tales como la Amígdala, Acumbens, Estriado Ventral, neocorteza e Hipocampo (Bermúdez-Rattoni, 2010). En este sentido, los resultados revisados indican que la actividad de PKM ζ juega un importante papel en el mantenimiento a largo plazo de recuerdos específicos, en todas las áreas estudiadas hasta la fecha.

Sin embargo, otra parte de los resultados obtenidos hasta el momento plantean la necesidad de considerar el papel de PKM ζ más allá de interpretaciones simplistas. Por un lado, diversos resultados parecen indicar que su inactivación puede interferir con una variedad de procesos mnésicos, además del mantenimiento de la memoria a largo plazo. Es el caso de los procesos de consolidación de recuerdos traumáticos (Cohen et al. 2010) o la detección de la novedad (Moncada y Viola, 2008), en el Hipocampo, en los que se emplean inyecciones de ZIP con cortos periodos de dilación. Por otra parte, el grado de interrupción en el caso de las memorias a largo plazo parece variar en función de la zona o del tipo de memoria. Ello pone de manifiesto la posibilidad de la existencia de una variedad de mecanismos con participación diferencial de PKM ζ y la necesidad de continuar investigando con una variedad de protocolos conductuales alterando los parámetros temporales.

En definitiva, la posibilidad de eliminar recuerdos no deseados ha abierto enormes expectativas en la comunidad. Sin embargo, aunque prometedores, los resultados obtenidos hasta el momento necesitan ser replicados, extendidos e integrados con el amplio cuerpo de conocimientos existente acerca de los mecanismos responsables del aprendizaje y la memoria. La manipulación de la actividad de PKM ζ sólo debe ser considerada en la actualidad como una útil herramienta experimental en este sentido.

Conclusiones

1. La actividad automantenida de PKMζ se ha revelado como necesaria para el mantenimiento a largo plazo de una variedad de tipos de memorias tanto declarativas como no declarativas.
2. Los efectos de la inactivación de PKMζ sobre recuerdos consolidados específicos de diversa naturaleza dependen del área cerebral intervenida selectivamente.
3. Se abre la posibilidad de que PKMζ participe en otras funciones mnésicas relacionadas con las primeras fases del proceso de consolidación.
4. Los resultados son congruentes con la existencia de múltiples sistemas de memoria disociables interaccionando a lo largo del tiempo durante los procesos de adquisición, consolidación y mantenimiento de los recuerdos.
5. Aunque la posibilidad de borrar recuerdos no deseados ya consolidados resulta prometedora, la investigación se encuentra en una fase inicial muy alejada de planteamientos relacionados con aplicaciones clínicas potenciales.

Contribución de los Autores

Los dos autores han contribuido por igual a la redacción de esta revisión. La tabla 1 ha sido realizada por Fernando Gámiz.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida por parte del MICINN (PSI2008-03933/PSI) y de la Junta de Andalucía (HUM 02763), con la contribución de fondos FEDER.

Referencias

1. Bliss, TVP and Lomo, T: **Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.** *J. Physiol.* 1973, **232**:331–356.
2. Cahill, L., McGaugh, J.L. and Weinberger, N.M. **The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember.** *Trends in Neurosci.* 2001, **24** (10) 578-581.
3. Cohen H, Kozlovsky N, Matar MA, Kaplan Z, Zohar J: **Mapping the brain pathways of traumatic memory: inactivation of protein kinase M zeta in different brain regions disrupts traumatic memory processes and attenuates traumatic stress responses in rats.** *Eur Neuropsychopharmacol.* 2010 Apr;**20(4)**:253-71.
4. Cooke, S.F. and Bliss, T.V. **Plasticity in the human central nervous system.** *Brain* 2006, **129**(Pt 7) 1659-1673.
5. Dudai Y: **Reconsolidation: the advantage of being refocused.** *Current Opinion in Neurobiology* 2006, **16**: 174-178.
6. Hardt O, Miguez PV, Hastings M, Wong J, Nader K: **PKMzeta maintains 1-day- and 6-day-old long-term object location but not object identity memory in dorsal hippocampus.** *Hippocampus* 2009 Oct 5. [Epub ahead of print]
7. Hebb, DO: **Organization of Behavior: a Neuropsychological Theory.** New York: John Wiley. 1949.
8. Hernandez AI, Blace N, Crary JF, Serrano PA, Leitges M, Libien JM, Weinstein G, Tcherapanov A, Sacktor TC: **Protein Kinase M ζ Synthesis from a Brain mRNA Encoding an Independent Protein Kinase C ζ Catalytic Domain.** *J Biol Chem* 2003, **278 (41)**: 40305-40316.
9. Kandel, E.R. (2001) **The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialog between Genes and Synapses.** *Science* **294** (5544) 1030-1038.
10. Kwapis JL, Jarome TJ, Lonergan ME, and Helmstetter FJ: **Protein Kinase Mzeta Maintains Fear Memory in the Amygdala but Not in the Hippocampus.** *Behav Neurosci.* 2009 August ; **123(4)**: 844–850.
11. Ling DS, Benardo LS, Sacktor TC: **Protein kinase Mzeta enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors.** *Hippocampus* 2006, **16(5)**: 443-452.
12. Ling DS, Benardo LS, Serrano PA, Blace N, Nelly MT, Crary JF, Sacktor TC: **Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance.** *Nat. Neuroscience* 2002, **5(4)**: 295-296.
13. Milner, B. Memory disturbance after bilateral hippocampal lesions. In: P. Milner y S. Glickman (Eds) **Cognitive processes and the brain.** Toronto: D. Van Nostrand Co. Inc, 1965.
14. Lømo, T: **The discovery of long-term potentiation.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*,2003, **358 (1432)**: 617–20.
15. Madroñal N, Gruart A, Sacktor TC, Delgado-García JM: **PKMzeta inhibition reverses learning-induced increases in hippocampal synaptic strength and memory during trace eyeblink conditioning.** *PLoS One.* 2010 Apr 29; **5(4)**: e10400.
16. McDonald, R.J., Devan, B.D. and Hong, N.S. **Multiple memory systems: the power of the interactions.** *Neurobiology of Learning and Memory*, 2004, **82**, 333-346.
17. McGaugh, J.L. **Memory. A century of consolidation.** *Science*, 2000, **287**, 248-251.

18. Miguez PV, Hardt O, Wu DC, Gamache K, Sacktor TC, Wang YT, Nader K. **PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking.** *Nat Neurosci.* 2010, **13(5)** 630-634.
19. Mizumori, S.J.Y., Yeshenko, O., Gill, K.M. and Davis, D.M. **Parallel processing across neural systems: implications for a multiple memory system hypothesis.** *Neurobiology of Learning and Memory*, 2004, **82**, 278-298.
20. Moncada D, Viola H: **PKM ζ inactivation induces special familiarity.** *Learn Mem* 2008, **15**: 810-814.
21. Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC: **Storage of Spatial Information by the Maintenance Mechanism of LTP.** *Science* 2006, **313**: 1141-1144.
22. Poldrack, R.A. and Packard, M.G. **Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies.** *Neuropsychologia*, 2003, **41**, 245-251.
23. Rodríguez-Ortiz, C.J. and Bermúdez-Rattoni, F. Memory reconsolidation or updating consolidation?. In: F. Bermúdez-Rattoni. **Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging.** CRC Press, 2007.
24. Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, Sublette E: **Persistent activation of the ζ isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993, **90**: 8342-8346.
25. Sacktor TC: **PKM ζ , LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage.** *Prog Brain Res* 2008, **169**: 27-40.
26. Sara SJ: **Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering.** *Learn Mem.* 2000,**7**: 73–84.
27. Serrano P, Friedman EL, Kenney J, Taubenfeld SM, Zimmerman JM, Hanna J, Alberini C, Kelley AE, Maren S, Rudy JW, Yin JCP, Sacktor TC, Fenton AA: **PKM ζ Maintains Spatial, Instrumental, and Classically Conditioned Long-Term Memories.** *PLoS Biol* 2008, **6(12)** e318: 2698-2706.
28. Serrano P, Yao Y, Sacktor TC: **Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta maintains late-phase long-term potentiation.** *J Neurosci* 2005, **25(8)**: 1979-84.
29. Shema R, Sacktor TC, Dudai Y: Rapid Erasure of Long-Term Memory Associations in the Cortex by an Inhibitor of PKM ζ . *Science* 2007, **317**: 951-953.
30. Shema R, Hazvi S, Sacktor TC, Dudai Y. **Boundary conditions for the maintenance of memory by PKMzeta in neocortex.** *Learn Mem.* 2009 **6(2)** 122-128.
31. Sacktor TC, Dudai Y: **Rapid Erasure of Long-Term Memory Associations in the Cortex by an Inhibitor of PKM ζ .** *Science* 2007, **317**: 951-953.
32. Squire, LR: **Memory and brain systems: 1969-2009.** *J. Neurosci.*, 2009, **29(41)**: 12711-12716.

CAPITULO 11

***Efectos de sulpiride y metoclopramide sobre los niveles de mRNA
de los isoenzimas de la 5 α Reductasa en cerebro de rata***

***P. Sánchez
J.M. Torres
B. Castro
E. Ortega***

Efectos de sulpiride y metoclopramide sobre los niveles de mRNA de los isoenzimas de la 5 α -Reductasa en cerebro de rata

Pilar Sánchez¹, Jesús M. Torres^{1,2}, Beatriz Castro¹, Esperanza Ortega^{1,2}

1, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España

2, Instituto de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España.

Autor para correspondencia:

Esperanza Ortega, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Avda. de Madrid s/n, 18012 Granada, España. Tel.: (+34)-958-243519. Fax: (+34)-958-249015.

Direcciones de correo electrónico:

PS: pilarsan@ugr.es

JMT: torrespi@ugr.es

BC: beillacb@hotmail.com

EO: esortega@ugr.es

Resumen

Introducción. La prolactina (PRL) promueve el comportamiento maternal, un complejo patrón de comportamiento dirigido a maximizar la supervivencia de la descendencia. Los neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos pueden regular también el comportamiento maternal. Además, la PRL, los neuroesteroides y el enzima 5 α -Reductasa (5 α -R), enzima limitante en la biosíntesis de estos esteroides neuroactivos, están incrementados en las situaciones de estrés. 5 α -R se expresa como dos isoenzimas 5 α -R1 y 5 α -R2, ambos presentes en diferentes regiones del cerebro, incluida la corteza prefrontal, y podrían estar implicados en el comportamiento maternal en ratas. Todo ello nos condujo a pensar en una posible interrelación entre los niveles de PRL y el enzima 5 α -R. En este estudio hemos cuantificado los niveles de mRNA de los dos isoenzimas de la 5 α -R en corteza prefrontal de ratas macho y hembra tras la administración de sulpiride y metoclopramide, ambos inductores de la secreción de PRL. **Resultados.** Los resultados demuestran un aumento significativo de los niveles de mRNA de ambos isoenzimas de la 5 α -R en ratas macho y hembra tras la administración tanto de sulpiride como de metoclopramide, bien de forma directa o a través de la hiperprolactinemia inducida por estos fármacos. **Conclusión.** Debido a los efectos ansiolíticos ejercidos por los neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos y por la PRL en respuesta al estrés, estas moléculas junto con los isoenzimas de la 5 α -R podrían participar en una ruta común de adaptación a situaciones de estrés.

Introducción

El comportamiento maternal es un complejo patrón de comportamiento dirigido a maximizar la supervivencia de la descendencia. El comportamiento maternal (CM) es un proceso que implica una intensa reorganización hipotalámica [1] que resulta en alteraciones de las funciones neuroendocrinas, incluyendo la prolactina (PRL). La prolactina promueve el CM [2], para estimular la PRL dicho CM es dependiente de esteroides [2]. La PRL juega un importante papel en el inicio y mantenimiento de la lactación, regula la producción y composición de la leche, y participa en la regulación del CM [4,5].

Los neurotransmisores están implicados en el desarrollo del sistema nervioso [6,7], en la diferenciación sexual del cerebro y en el CM [8-15]. Nuestro grupo de investigación previamente había demostrado que el neurotransmisor GABA a través del receptor GABA_A participa en la diferenciación sexual del cerebro de rata [14]. Por consiguiente, la administración postnatal de diazepam (DZ) un agonista del receptor GABA_A a ratas macho y picrotoxina (PTX) un antagonista a ratas hembra alteró las diferencias sexuales en el comportamiento parental adulto y en el número de células mitrales del bulbo olfatorio accesorio (AOB) en el adulto [14].

Los neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos regulan el receptor GABA_A de manera similar al DZ, por lo tanto es razonable especular que esos neuroesteroides regulan el CM de manera similar a las benzodiazepinas [16-18]. Los neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos son sintetizados a partir de la progesterona y deoxicorticosterona (DOC) por la enzima esteroideogénica 5 α -Reductasa (5 α -R) y 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HSD), siendo la primera la enzima limitante de la reacción. 5 α -R es expresada como dos isoenzimas, 5 α -R1 y 5 α -R2, ambas están presentes en diferentes regiones del cerebro, incluyendo la corteza prefrontal [19-22], y deben estar implicadas en el CM de la rata.

El CM está influenciado por el estrés [23,24]. Las situaciones de estrés incrementan los niveles de neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos [16,25,26] y los niveles de mRNA de ambas isoenzimas 5 α -reductasa [27]. La prolactina ha sido considerada como un potente regulador del estrés, actuando en varias regiones del cerebro [1,2,28-31]. La prolactina y los neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos ejercen un profundo efecto ansiolítico en machos y hembras [29,32,33]. Estos hallazgos nos permiten hipotetizar una posible interrelación entre PRL y 5 α -R, la enzima clave en la biosíntesis de los neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos.

El objetivo de este estudio fue cuantificar los niveles de mRNA de ambas isoenzimas 5 α -R en la corteza prefrontal de ratas macho y hembra después de la administración de sulpiride y metoclopramide, ambos inductores de la secreción de PRL.

Resultados

Niveles plasmáticos de hormonas

Después del tratamiento de metoclopramide y sulpiride, las ratas macho y hembra mostraron un significativo incremento en los niveles de prolactina en comparación con sus respectivos controles (Fig. 1).

Cuantificación de los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en corteza prefrontal

La cantidad de mRNA fue expresada como el número de moléculas de mRNA por mg de RNA

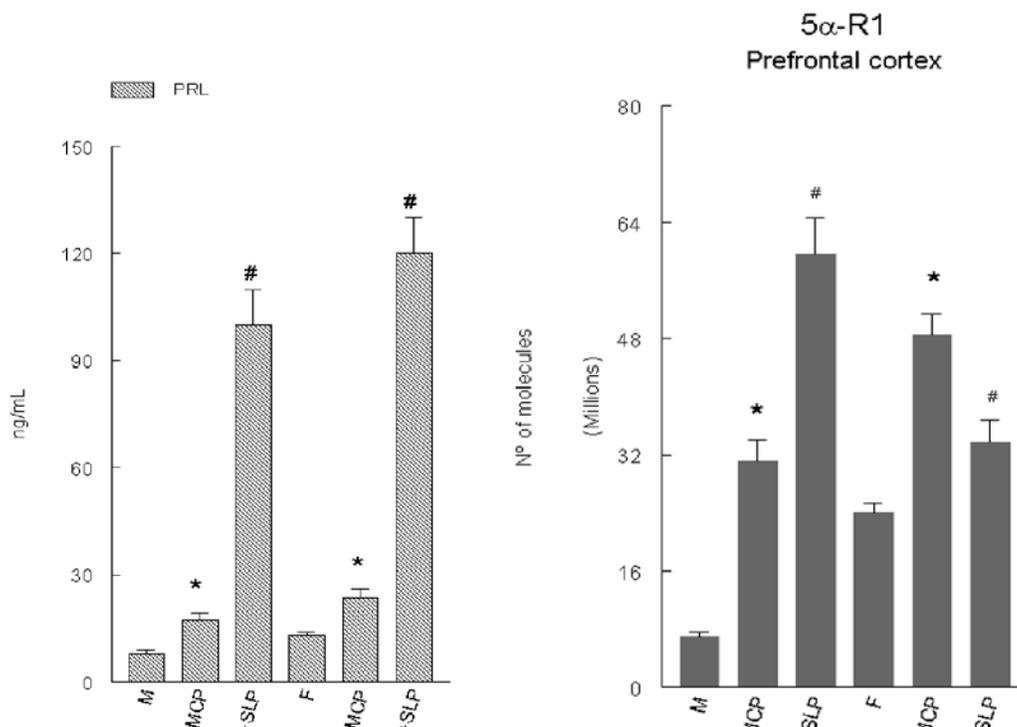


Figura 1. Niveles plasmáticos de prolactina
Niveles plasmáticos de prolactina en ratas macho y hembra control y tratadas con metoclopramide y sulpiride M (macho control); M+MCP (macho tratado-metoclopramide); M+ SLP (macho tratado-sulpiride); F (hembra control); F+MTC (hembra tratada-metoclopramide); F+SLP (hembra tratada-sulpiride)
*P<0.001 vs. animales M. #P<0.001 vs. animales F

Figura 2. Efectos de prolactina en los niveles de RNAm de 5 α -Reductasa 1
Efectos de prolactina en los niveles de mRNA de 5 α -Reductasa 1 (5 α -R1) en corteza prefrontal de ratas macho y hembras control y tratadas con metoclopramide y sulpiride M (macho control); M+MCP (macho tratado-metoclopramide); M+ SLP (macho tratado-sulpiride); F (hembra control); F+MTC (hembra tratada-metoclopramide); F+SLP (hembra tratada-sulpiride).
*P<0.001 vs. animales M. #P<0.01 vs. animales F

total. Después de la síntesis del cDNA a partir del RNA total por retrotranscripción, fue coamplificado en la presencia de cantidades decrecientes de DNA competitivo (64×10^6 a 0.5×10^6 moléculas). El cDNA de 5 α -R1 y el DNA competidor IS-1 fueron coamplificados usando el mismo par de primers. Con cantidades decrecientes de DNA competitivo, aumenta la intensidad relativa del producto amplificado DNA problema. El ratio de fluorescencia de 5 α -R1/IS-1 fue determinado a través de la cantidad de ADN competitivo IS-1. La cuantitativa RT-PCR reveló significativamente mayores niveles de mRNA de la 5 α -R1 en corteza prefrontal de ratas hembra que en ratas macho (Fig.2). Después del tratamiento de metoclopramide y sulpiride, hubo un significado incremento en los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en la corteza prefrontal de ratas macho y hembras en comparación con sus respectivos controles (Fig.2).

Cuantificación de los niveles de mRNA de la 5 α -R2 en corteza prefrontal

Asimismo, el cDNA de la 5 α -R2 y el DNA competidor IS-2 fueron coamplificados usando el mismo par de primers. Con cantidades decrecientes de DNA competitivo, aumenta la intensidad relativa del producto amplificado DNA problema. El ratio de fluorescencia de 5 α -R2/IS-2 fue determinado a través de la cantidad de ADN competitivo IS-2. La cuantitativa RT-PCR reveló significativamente mayores niveles de mRNA de la 5 α -R2 en corteza prefrontal de ratas hembra que en ratas macho (Fig.3). Después del tratamiento de metoclopramide y sulpiride, hubo un significado incremento en los niveles de mRNA de la 5 α -R2 en la corteza prefrontal de ratas macho y hembras en comparación con sus respectivos controles (Fig.3).

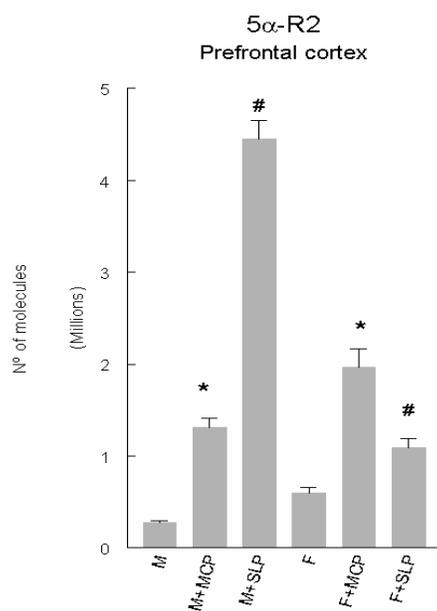


Figure 3

Figura 3. Efectos de prolactina en los niveles de RNAm de 5 α -Reductasa 2. Efectos de prolactina en los niveles de mRNA de 5 α -Reductasa 2 (5 α -R2) en corteza prefrontal de ratas macho y hembras control y tratadas con metoclopramide y sulpiride M (macho control); M+MCP (macho tratado-metoclopramide); M+ SLP (macho tratado-sulpiride); F (hembra control); F+MTC (hembra tratada-metoclopramide); F+SLP (hembra tratada-sulpiride)

*P<0.001 vs. animales M. #P<0.01 vs. animales F

Análisis regresión lineal

No hubo correlación lineal entre los niveles plasmáticos de prolactina y los niveles de mRNA de la 5 α -R1 o 5 α -R2.

Discusión

Los resultados muestran, a nuestro conocimiento por primera vez, que sulpiride y metoclopramide están asociados con un incremento en los niveles de mRNA de los isoenzimas 5 α -R en corteza prefrontal de ratas macho y hembra, con un incremento superior en macho que en hembras. Los efectos de metoclopramide y sulpiride en los niveles de mRNA de 5 α -R1 y 5 α -R2 pueden ser ejercidos vía hiperprolactinemia inducida por sulpiride y metoclopramide, ya que ambos fármacos son antagonista del receptor dopamina tipo 2 (D2), un mediador de dopamina induce la inhibición en la secreción de prolactina [34]. Previamente fue demostrado que la hiperprolactinemia en ratas incrementa la actividad de 5 α -R en la glándula prostática. Dado que hay evidencias del receptor D2 en la próstata de rata [35], es importante señalar que la hiperprolactinemia fue inducida en esos estudios por sulpiride [36] o tras la administración de prolactina ovina [37] indicando un efecto directo de PRL en la actividad 5 α -R.

Aunque los efectos directos de sulpiride y metoclopramide sobre los niveles de mRNA de las isoenzimas 5 α -R deberían ser tenidos en mente, estos resultados muestran como dos drogas que producen hiperprolactinemia incrementan la transcripción de ambos genes 5 α -R, a pesar de tener una estructura química y propiedades farmacológicas muy diferentes. Sulpiride pertenece al grupo de antipsicóticos derivada de la benzamida sustituida y es usado en tratamientos de ansiedad, fobias, desórdenes compulsivos obsesivos, esquizofrenia,

paranoia, delirio y otras enfermedades, algunas de las cuales están asociadas con un decremento en neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos [38-42]. Sulpiride puede por tanto incrementar los niveles de mRNA de ambas isoenzimas 5 α -R, enzima clave y limitante. En contraste, metoclopramide es gastrocinético y es usado como un anti-emético y estimula la movilidad intestinal, pero incrementa los niveles de mRNA de ambas isoenzimas 5 α -R y prolactina.

Nuestros resultados pueden tener un importante significado fisiológico. De hecho, 5 α -R1 fue previamente considerada un enzima constitutivo que protege a las neuronas del exceso de glucocorticoides que induce la apoptosis [43,44]. Sin embargo, nuestro grupo previamente demostró que 5 α -R1 puede tener otras funciones además de la función catabólica, por ejemplo, la biosíntesis de neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos [19]. Algunas publicaciones apoyan esta hipótesis: los niveles de mRNA de 5 α -R1 son mayores en ratas hembra que en macho [19,22], y los niveles de neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos son también mayores en ratas hembra que en macho [45].

5 α -R2 es considerada un enzima androgénica [19,44,46] que puede producir dihidrotestosterona en el cerebro de rata macho en condiciones fisiológicas, permitiendo establecer y mantener el dimorfismo sexual de algunas regiones del cerebro [19,20,22]. En ratas hembra, 5 α -R2 puede servir para sintetizar neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos, ya que los niveles de progesterona (para los cuales esas isoenzimas tienen alta afinidad) [47] son mucho mayores en hembras que en machos. En nuestro estudio el incremento de ambas isoenzimas 5 α -R en ratas macho y hembra tras la administración de sulpiride y metoclopramide, puede conllevar a un incremento en los niveles de neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos en el cerebro.

Numerosos autores han observado modificaciones en los niveles de neuroesteroides en plasma y cerebro de roedores en diferentes situaciones de estrés [48,49], diferenciando entre los efectos de estrés crónico y agudo [50]. Asimismo, estudios en humanos han mostrado que situaciones de estrés agudo (p. ej. intoxicación alcohólica) incrementan los niveles plasmáticos de allopregnanolona (neuroesteroide 3 α ,5 α -reducido) en adolescentes macho y hembra [25,26]. Recientemente, nuestro grupo demostró que situaciones de estrés agudo también incrementan los niveles de ambas isoenzimas 5 α -R en corteza prefrontal de ratas [27].

Durante la lactancia, la PRL regula la producción y composición de la leche en la glándula mamaria y el CM [4,5]. Además de esas funciones, la PRL también es un potente modulador de las respuestas de estrés [28]. En el cerebro es probable que la PRL atenué el estrés induciendo la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) y corticosterona a la sangre [2], promoviendo significadas adaptaciones a las respuestas de estrés emocional y neuroendocrinal [51-55].

Los elevados niveles de PRL inducidos por metoclopramide y sulpiride están asociados con un incremento en los niveles de mRNA de ambas isoenzimas 5 α -R. Aunque no hay una correlación lineal entre PRL y mRNA de 5 α -R1 o 5 α -R2, probablemente se deba por la diferencia sexual en los niveles de mRNA de las isoenzimas en respuesta a la PRL inducida por la misma dosis de metoclopramide y sulpiride (ver figuras). La PRL y los neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos son secretados en situaciones de estrés [16,25,26,51-55] y tienen efectos ansiolíticos [2,16]. Por lo tanto, posiblemente participan en una vía común para la adaptación a las situaciones de estrés.

Interesantemente, aunque sulpiride y metoclopramide incrementan los niveles de mRNA de ambas isoenzimas 5 α -R en cerebro de rata adulta, no tienen idénticos efectos. En ratas macho, los niveles de mRNA de 5 α -R1 incrementaron menos por metoclopramide (4.5

veces) que por sulpiride (8.5 veces), y los niveles de mRNA de 5 α -R2 también incrementaron menos por metoclopramide (4.5 veces) que por sulpiride (16 veces). En ratas hembras, los niveles de mRNA de 5 α -R1 incrementaron más por metoclopramide (3.3 veces) que por sulpiride (1.8 veces). Estas diferencias en la regulación de los isoenzimas 5 α -R-1 y 5 α -R2 después de la administración de sulpiride y metoclopramide no pueden ser sólo atribuidas a la hiperprolactinemia inducida por esas drogas, ya que la respuesta de ambos sexos debería ser la misma cuando este fuese el caso. Por lo tanto, otros factores inducidos por estas drogas, además de prolactina, puede intervenir en la regulación de ambos isoenzimas 5 α -R.

Conclusiones

El incremento en los isoenzimas 5 α -R inducido por metoclopramide y sulpiride pueden producir un incremento en los neuroesteroides 3 α ,5 α -reducidos, los cuales pueden posiblemente participar en una ruta común con la prolactina en la inducción y mantenimiento del comportamiento maternal y la lactancia.

Métodos

Animales

Ratas adultas macho y hembra Wistar de peso 260-280 g y 180-200 g, respectivamente, fueron mantenidas en el animalario con aire acondicionado e iluminación desde las 7:00 horas hasta 19:00 horas y fueron alimentadas con dieta estándar de mantenimiento A04 (Panlab) y agua *ad lib*. Los experimentos fueron realizados acorde a la guía NIH para el "Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio." La hiperprolactinemia crónica fue inducida por la administración de metoclopramide y sulpiride. Al grupo experimental que se le administró metoclopramide (Primperan) intraperitonealmente se realizó en una dosis de 2.2 mg/Kg dos veces semanalmente durante 14 días de acuerdo con Stuczankowska-Glabowska y col. [56] y al grupo experimental que se le administró sulpiride (Sigma) intraperitonealmente se realizó en una dosis de 40mg/Kg de acuerdo a Van Coppenolle y col. [57]. Las ratas grupo control se les administró solución salina. Las ratas fueron siempre inyectadas a las 9.00 a.m.

A los 30 minutos después de la última inyección, las ratas fueron matadas por decapitación para evitar posibles efectos adversos de la anestesia. Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos que contenían heparina. Después de la coagulación, la sangre fue centrifugada a 2000 rpm durante 10 min. El plasma fue separado y guardado a -20 °C hasta su análisis. La disección del área de la corteza prefrontal fue realizada tomando como referencia el Atlas estereotáxico del cerebro de rata Paxino y Watson [58]. Una vez extraído el cerebro se dividen los dos hemisferios con un corte sagital y a su vez, de cada hemisferio se hacen dos cortes coronales delimitados por los planos coronales entre 3.7 mm – 2.2 mm anteriores a bregma del Atlas. Posteriormente, de cada lámina se separa un rectángulo que delimita las áreas; corteza cingular anterior, prelímbica e infralímbica.

Análisis Hormonal

Los niveles plasmáticos de prolactina fueron medidos por ELISA usando un kit enzimático inmunoradiométrico (Milenia, Rat Prolactin, Alemania). Todas las muestras fueron analizadas en duplicado y en el mismo ensayo. El coeficiente de variación intra-ensayo fue 4.3% y la sensibilidad fue 0.6 ng/ml.

Oligonucleótidos usados para las amplificaciones

Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las isoenzimas 5 α -R tipo 1 y tipo 2 de rata fueron obtenidas del GeneBank® (J05035, M95058), y la secuencia plasmídica pEGFP-C1 se obtuvo de la página web Clontech. Esas secuencias eran usadas para diseñar los pares de primers. Todos los primers forward estaban marcados con 6-carboxi-fluoresceína (6-FAM), en posición 5'. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por PE-Applied Biosystems (Warrington, UK). Las secuencias de los primers (5'-3') y el tamaño de los productos de PCR fueron como previamente se describió [59].

Construcción del estándar interno

Dos moléculas competitivas de 300 pb fueron sintetizadas como estándares interno (IS-1, y IS-2) de acuerdo a Torres y Ortega [59].

Reverso transcripción-PCR

El RNA total fue extraído a partir de 25 mg de corteza prefrontal de rata mediante Tiocionato de Guanidina-Fenol-Cloroformo [60]. El RNA se resuspendió en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) y fue cuantificado espectofotométricamente. La reverso transcripción fue llevada a cabo de acuerdo a Torres y Ortega [59]. El programa de la PCR fue: desnaturalización a 94°C durante 30 seg.; anillamiento 44°C durante 30 seg.; y extensión 72°C durante 30 seg. El número de ciclos fue 35 en todos los casos. La PCR fue llevada a cabo en un Perkin-Elmer 2400 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, California, USA).

Análisis de los productos de PCR

Un sistema de electroforesis capilar de fluorescencia inducida por láser (LIF-CE ABIPRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystem) fue utilizado para caracterizar los productos de RT-PCR. Las condiciones de electroforesis capilar fueron llevadas a cabo de acuerdo a Torres y Ortega [59]. Los ratios de fluorescencia de 5 α -R/IS fueron determinados a través de la cantidad apropiada de ADN competitivo, y la concentración de ADN de la muestra fue calculada de acuerdo a Torres y Ortega [59].

Análisis estadístico

Los resultados fueron llevados a cabo usando un test de Student's. Los datos fueron expresados como media \pm SD. La correlación de los estudios fueron realizados entre los valores de prolactina y los niveles de mRNA de 5 α -R1 y 5 α -R2. El valor P menor que 0.005 fue considerado significativo.

Contribución de los autores

PS realizó los experimentos y analizó los datos. JMT concibió el concepto del estudio, participó en el diseño técnico del experimento y contribuyó a la interpretación de los resultados. BC participó en la realización de los experimentos. EO participó en el diseño técnico del experimento y contribuyó a la interpretación de los resultados y escritura del manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado en parte por los Fondos europeos de desarrollo regional (FEDER) mediante el proyecto BFU2008-05340 y la Consejería de Innovación Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (Grupo CTS-202 "Endocrinología y Metabolismo").

Referencias

1. Torner L, Maloumby R, Nava G Aranda J, Clapp C, Neumann ID: **In vivo release and gene upregulation of brain prolactin in response to physiological stimuli.** *Eur. J. Neurosci.* 2004, **19**:1601–1608
2. Donner N, Bredewold R, Maloumby R, Neumann ID: **Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats.** *Eur. J. Neurosci.* 2007, **25**:1804–1814
3. Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE: **Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, **87**:8003–8007
4. Bridges RS, DiBiase R, Loundes DD, Doherty PC: **Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats.** *Science* 1985, **227**:782–784
5. Bridges RS, Ronsheim PM: **Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior.** *Endocrinology* 1990; **126**:837–848
6. Mattson MP: **Neurotransmitters in the regulation of neural cytoarchitecture.** *Brain Res. Rev.* 1988, **13**:179–212
7. Lipton SA, Kater SB: **Neurotransmitter regulation of neural outgrowth, plasticity and survival.** *Trends Neurosci.* 1989, **12**:265–270
8. Dörner G: *Hormones and sexual differentiation of the brain. Sex hormones and behavior*, Ciba Foundation Symposium 62. Elsevier, Amsterdam; 1979, 81–110
9. Mattson MP: **Neurotransmitters in the regulation of neural cytoarchitecture.** *Brain Res. Rev.* 1988, **13**:179–212
10. Dölher KD: **The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus.** *Int. Rev. Cytol.* 1991, **131**:1–57
11. Segovia S, Pèrez-Laso C, Rodríguez-Zafra M Calés JM, Del Abril A, De Blas MR, Collado P, Valencia A, Guillamón A: **Early postnatal diazepam exposure alters sex differences in the rat brain.** *Brain Res. Bull.* 1991, **26**:899–907
12. Bach F, Flugge G, Wuttke W: **GABAergic influences on the development of the sexually dimorphic nucleus in male and female rats.** *Brain Res.* 1992, **573**:341–344
13. Pèrez-Laso C, Valencia A, Rodríguez-Zafra M, Calés JM, Guillamón A, Segovia S: **Perinatal administration of diazepam alters sexual dimorphism in the rat accessory olfactory bulb.** *Brain Res.* 1994, **634**:1–6
14. Segovia S, Del Cerro MCR, Ortega E, Pérez-Laso C, Rodríguez-Zafra C, Izquierdo MA, Guillamón A: **Role of GABAA receptor in the organization of brain and behavioral sex differences.** *Neuroreport* 1996, **7**:2553–2557
15. Kincl FA, Maqueo M: **Prevention by progesterone of steroid induced sterility in neonatal male and female rats.** *Endocrinology* 1965, **77**:859–862
16. Purdy RH, Morrow AL, Moore PH Jr, Paul SM: **Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, **88**:4553–4557
17. Majewska MD: **Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance.** *Prog. Neurobiol.* 1992, **38**:379–395
18. Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA: **Biosynthesis and action of neurosteroids.** *Brain Res. Brain Rev.* 2001, **37**:3–12

19. Torres JM, Ortega E: **Differential regulation of steroid 5 α -Reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain.** *FASEB J.* 2003, **17**:1428–1433
20. Sánchez P, Torres JM, Ortega E: **Effects of dihydrotestosterone on brain mRNA levels of steroid 5 α -Reductase isozymes in early postnatal life of rat.** *Neurochem. Res.* 2005, **30**:577–581
21. Sánchez P, Torres JM, Del Moral RG, Ortega E: **Effects of testosterone on brain mRNA levels of steroid 5 α -reductase isozymes in early postnatal life of rat.** *Neurochem. Int.* 2006, **49**:626–630
22. Torres JM, Ortega E: **Steroid 5 α -Reductase isozymes in the adult female rat brain: central role of dihydrotestosterone.** *J. Mol. Endocrinol.* 2006, **36**:239–245
23. Smith JW, Seckl JR, Evans AT, Costall B, Smythe JW: **Gestational stress induces postpartum depression-like behaviour and alters maternal care in rats.** *Psychoneuroendocrinology* 2004, **29**:227–244
24. Patin V, Lordi B, Vincent A, Thoumas JL, Vaudry H, Caston J: **Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat.** *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2002, **139**:1–8
25. Torres JM, Ortega E: **Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in female adolescent humans.** *Neuropsychopharmacology* 2003, **28**:1207–1209
26. Torres JM, Ortega E: **Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in male adolescent humans.** *Psychopharmacology* 2004, **172**:352–355
27. Sánchez P, Torres JM, Gavete P, Ortega E: **Effects of swim stress on mRNA and protein levels of steroid 5 α -reductase isozymes in prefrontal cortex of adult male rats.** *Neurochem. Int.* 2008, **52**:426–31
28. Drago F, Continella G, Conforto G, Scapagnini U: **Prolactin inhibits the development of stress-induced ulcers in the rat.** *Life Sci.* 1985, **36**:191–197
29. Torner L, Toschi N, Pohlinger A, Landgraf R, Neumann ID: **Anxiolytic and antistress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling.** *J. Neurosci.* 2001, **21**:3207–3214
30. Torner L, Neumann ID: **The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation.** *Stress* 2002, **5**:249–257
31. Fujikawa T, Tamura K, Kawase T, Mori Y, Sakai RR, Sakuma K, Yamaguchi A, Ogata M, Soya H, Nakashima K: **Prolactin receptor knockdown in the rat paraventricular nucleus by a morpholinoantisense oligonucleotide causes hypocalemia and stress gastric erosion.** *Endocrinology* 2005, **146**:3471–3480
32. Crawley JN, Glowa JR, Majewska MD, Paul SM: **Anxiolytic activity of an endogenous adrenal steroid.** *Brain Res.* **29**:382–385
33. Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Purdy RH, Mostallino MC, Concas A, Biggio G: **The effects of inhibitors of GABAergic transmission and stress on brain and plasma allopregnanolone concentrations.** *Br. J. Pharmacol.* 1997, **120**:1582–1588
34. Debeljuk L, Rozados R, Daskal H, Velez V, Mancini AM: **Acute and chronic effects of sulpiride on serum prolactin and gonadotropin levels in castrated male rats (38581).** *Proc. Soc. Biol. Med.* 1975, **148**:550–552
35. Amenta D, Cavallotti C, Amenta F: **Dopamine receptors mediating the stimulation and the inhibition of adenylate cyclase in rat prostate gland.** *Neurosci. Lett.* 1987, **77**:66–70
36. Van Coppenolle F, Le Bourhis X, Carpentier F, Delaby G, Cousse H, Raynaud JP, Dupouy JP, Prevarskaya N: **Pharmacological effects of the lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on rat prostate hyperplasia induced by hyperprolactinemia: comparison with finasteride.** *Prostate* 2000, **43**:49–58

37. Yamanaka H, Kirdani RY, Saroff J, Murphy GP, Sandberg AA: **Effects of testosterone and prolactin on rat prostatic weight, 5 α -reductase, and arginase.** *Am. J. Physiol.* 1975, **229**:1102–1109
38. Uzunova V, Sheline Y, Davis JM, Rasmusson A, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A: **Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, **95**:3239–3244.
39. Dong E, Matsumoto K, Uzunova V, Sugaya I, Takahata H, Nomura H, Watanabe H, Costa E, Guidotti A: **Brain 5 α -dihydroprogesterone and allopregnanolone synthesis in a mouse model of protracted social isolation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2001, **98**:2849–2854.
40. Guidotti A, Dong E, Matsumoto K, Pinna G, Rasmusson AM, Costa E: **The socially-isolated mouse: a model to study the putative role of allopregnanolone and 5 α -dihydroprogesterone in psychiatric disorders.** *Brain Res. Rev.* 2001, **37**:110–115.
41. Van Broekhoven F, Verkes RJ: **Neurosteroids in depression: a review.** *Psychopharmacology* 2003, **165**:97–110.
42. Marx CE, Stevens RD, Shampine LJ, Uzunova V, Trost WT, Butterfield MI, Massing MW, Hamer RM, Morrow AL, Lieberman JA: **Neuroactive steroids are altered in schizophrenia and bipolar disorder: relevance to pathophysiology and therapeutics.** *Neuropsychopharmacology* 2006; **31**:1249–1263.
43. Mahendroo MS, Cala KM, Landrum DP, Russell DW: **Fetal death in mice lacking 5 α -Reductase type 1 caused by estrogen excess.** *Mol. Endocrinol.* 1997, **11**:917–927
44. Poletti A, Coscarella A, Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, Martini L: **5 α -Reductase isozymes in the central nervous system.** *Steroids* 1998, **63**:246–251
45. Torres JM, Ruiz E, Ortega E: **Effects of CRH and ACTH administration on plasma and brain neurosteroid levels.** *Neurochem. Res.* 2001, **26**:555–558
46. Torres JM, Ruiz E, Ortega E: **Development of a quantitative RT-PCR method to study 5 α -Reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status.** *Prostate* 2003, **56**:74–79
47. Negri-Cesi P, Poletti A, Celotti F: **Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5 α -Reductase and Aromatase in brain differentiation and functions.** *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1996, **58**:455–466
48. Biggio G, Concas A, Mostallino MC, Purdy RH, Trabucchi M, Barbaccia ML: **Inhibition of GABAergic transmission enhances neurosteroid concentrations in the rat brain.** In *The brain: source and target for sex steroid hormones.* Edited by Genazzi AR, Petraglia F, Purdy RH. New York, Parthenon Press; 1996:43–62
49. Biggio G, Barbaccia ML, Follesa P, Serra M, Purdy RH, Concas A: **Neurosteroids and GABA_A receptor plasticity.** In *GABA in the nervous system.* Edited by Olsen RW, Martin DL. New York, Lippincott; 2000:207–232
50. Barbaccia ML, Serra M, Purdy RH, Biggio G: **Stress and neuroactive steroids.** *Int. Rev. Neurobiol.* 2001, **46**:243–272
51. Russell JA, Johnstone H, Douglas AJ, Landgraf R, Wigger A, Shipston M, Seckl JR, Neumann. ID: **Neuroendocrine stress mechanisms regulating ACTH and oxytocin in pregnancy.** In *Control mechanisms of stress and emotions: neuroendocrine-based studies.* Edited by Yamashita H. Amsterdam, Elsevier; 1999:33–51
52. Toufexis DJ, Walker CD: **Noradrenergic facilitation of the adrenocorticotropin response to stress is absent during lactation in the rat.** *Brain Res.* 1996, **737**:71–77

53. Lightman S, Windle R, Wood S, Kershaw YM, Shanks N, Ingram CD: **Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis.** *Prog. Brain Res.* 2001, **133**:111–129
54. Neumann ID, Toschi N, Ohi F, Torner L, Krömer SA: **Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin.** *Eur. J. Neurosci.* 2001, **13**:1016–1024
55. DeWeerth C, Buitelaar J: **Physiological stress reactivity in human pregnancy—a review.** *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005, **29**:295–312
56. Słuczanaowska-Głabowska S, Laszczyńska M, Głabowski W, Wylot M: **Morphology of the epithelial cells and expression of androgen receptor in rat prostate dorsal lobe in experimental hyperprolactinemia.** *Folia Histochem. Cytobiol.* 2006, **44**:25–30
57. Van Coppenolle F, Slomianny C, Carpentier F, Le Bourhis X, Ahidouch A, Croix D, Legrand G, Dewailly E, Fournier S, Cousse H, Authie D, Raynaud JP, Beauvillain JC, Dupouy JP, Prevarskaya N: **Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno-dependence.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001, **280**:120–129
58. Paxinos G, Watson C: *The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd edn.* Academic Press, New York 1986
59. Torres JM, Ortega E: **Quantitation of mRNA levels of steroid 5 α -Reductase isozymes: a novel method that combines quantitative RT-PCR and capillary electrophoresis.** *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2004, **36**:78–88
60. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal. Biochem.* 1987, **162**:156–159

CAPITULO 12

Estrés oxidativo y protéico en la enfermedad de Huntington

***R. Duran
F.J. Barrero
B. Morales
J.D. Luna
M. Ramírez
F. Vives***

Estrés oxidativo y proteico en la enfermedad de Huntington

Raquel Duran¹, Francisco J. Barrero², Blas Morales², Juan D. Luna³, Manuel Ramírez⁴, Francisco Vives¹

1, Instituto de Neurociencias “Federico Olóriz”, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Granada, Granada, España

2, Unidad de Trastornos del Movimiento, Hospital Universitario “San Cecilio”, Granada, España

3, Departamento de Estadística, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España

4, Unidad de Fisiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén, Jaén, España

Autor para correspondencia:

Francisco Vives, Instituto de Neurociencias “Federico Olóriz”, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Granada, Avda. del Conocimiento, s/n, Campus de la Salud, 1800- Armilla. Granada, España

Direcciones de correo electrónico:

RD: rduran@ugr.es
FJB: fjbarreroh@hotmail.com
BMG: blasmorales@saludalia.com
JDL: jd luna@ugr.es
MRS: msanchez@ujaen.es
FV: fives@ugr.es

Resumen

Introducción: La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa de carácter hereditario con un patrón de herencia autosómico dominante. Se ha propuesto que el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la alteración del metabolismo proteico están implicados en los mecanismos moleculares responsables de su patogénesis. Sin embargo, a día de hoy se desconoce la contribución exacta de estos fenómenos en la aparición y la progresión de la EH, existiendo pocos estudios en sangre periférica. Nuestro propósito fue analizar las concentraciones plasmáticas de lípidos peroxidados (LPO) y lactato (LAC), como biomarcadores de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, en pacientes con EH sintomáticos (sEH) y portadores de EH asintomáticos (aEH). Además analizamos la actividad plasmática de las aminopeptidasas (APs), un importante grupo de enzimas proteolíticas abundantes en el cerebro. **Resultados:** Nuestros resultados mostraron elevadas concentraciones de LPO y LAC en el grupo sEH pero no el grupo aEH comparados con el grupo de controles sanos (C). En cambio, la actividad AP fue menor en ambos grupos de EH, siendo el descenso significativo para la

aspartato- y glutamato-AP. **Conclusiones:** Los pacientes con EH están sometidos a estrés oxidativo, que puede favorecer la progresión de la enfermedad. El descenso general de la actividad AP fue anterior a la aparición de los síntomas y del estrés oxidativo, sugiriendo que tiene un papel importante en la alteración del metabolismo proteico en los pacientes con EH. Se concluye que las terapias dirigidas a disminuir el estrés oxidativo y a normalizar la actividad AP pueden ser útiles en el tratamiento de la EH.

Introducción

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa de carácter hereditario con un patrón de herencia autosómico-dominante [1], y baja prevalencia (3-5 casos/100.000 habitantes). Es una enfermedad de inicio relativamente temprano, la sintomatología suele aparecer en la cuarta década de la vida, en personas que hasta entonces habían sido normales. Clínicamente se caracteriza por la aparición de movimientos involuntarios, acompañados de cambios emocionales, déficit cognitivo y pérdida de peso. Los síntomas derivan de la pérdida progresiva de neuronas espinosas de tamaño medio del núcleo estriado. El déficit genético responsable de la enfermedad es la expansión del triplete CAG en el gen que codifica la proteína huntingtina (htt), dando lugar a una cola de poliglutamina (poli-Q) en su región N-terminal. Esta htt mutada es defectuosa y tiende a acumularse formando unos agregados intracelulares llamados cuerpos de inclusión que constituyen el marcador patológico característico de la enfermedad.

La contribución de estos agregados a los procesos neurodegenerativos no está clara. Es posible que la muerte neuronal tenga lugar como consecuencia de la alteración y/o el secuestro de otras moléculas por parte de la htt mutada [2]. Pero también se han identificado otros procesos moleculares similares a los encontrados en otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Alzheimer (EA), destacando los fenómenos de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial [2, 3], y la alteración del metabolismo proteico [4].

La disfunción mitocondrial, junto con el deterioro del funcionamiento de la cadena respiratoria, causa un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno [2, 5]. Además, la mitocondria es considerada como una de las principales fuentes productoras de radicales libres. Estas condiciones de estrés oxidativo favorecen la oxidación de lípidos polinsaturados de lipoproteínas y membranas, llamados LPO (del inglés lipid peroxides). Estos LPO han sido propuestos como biomarcadores in vivo de estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas [5].

Por otra parte, la EH se caracteriza además por una alteración del metabolismo proteico, que va a dar lugar a los cuerpos de inclusión. Relacionadas con el metabolismo proteico y peptídico, en el cerebro existe un amplio grupo de enzimas conocidas como aminopeptidasas (APs). Estas enzimas desempeñan un papel muy importante en el control de la función de los neuropéptidos [6]. A pesar de su abundancia, hay pocos trabajos sobre el papel que juegan en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas. Algunos de los neuropéptidos, como colecistokinas, angiotensinas y encefalinas, coexisten con la dopamina en el estriado. Además, están presentes también en otras fibras nerviosas procedentes de la corteza prefrontal que modulan funciones autónomas y endocrinas. Estos péptidos, una vez que llevan a cabo su función, son degradados por las APs. El estudio de los cambios de la actividad enzimática de las APs puede aportar luz al conocimiento de las causas y de la progresión de la EH.

El propósito de este trabajo fue analizar los biomarcadores plasmáticos del estrés oxidativo y la actividad enzimática de las APs en pacientes con la enfermedad de Huntington, sintomáticos y asintomáticos.

Resultados

Caracterización de los sujetos

La distribución por edad y sexo fue similar en los tres grupos de estudio (ver tabla 1). La

Tabla 1. Distribución por edad y sexo de los grupos de estudio. La edad se expresa en años. Los valores representan la media \pm SEM. El sexo se expresa en frecuencias absolutas. n = número de sujetos.

Grupo	n	Edad	Sexo	
Control	60	48.02 \pm 2.377	Hombre	30
			Mujer	30
aEH	7	34.43 \pm 2.590	Hombre	2
			Mujer	5
sEH	24	48.42 \pm 2.437	Hombre	10
			Mujer	14

tabla 2 muestra los resultados de las principales variables clínicas en los grupos aEH y sEH. El número de repeticiones CAG fue similar en ambos grupos. La puntuación de la escala motora

Tabla 2. Características clínicas de los grupos aEH y sEH. La edad de inicio y la duración de la enfermedad se expresan en años. Los estadios de la enfermedad se basan en la puntuación obtenida en la escala TFC y los valores representan frecuencias absolutas. Los valores restantes representan la media \pm SEM. ND = no determinado. ***P < 0.001, diferencias frente al grupo aEH.

	aEH	sEH
Edad de inicio	NA	40.045 \pm 3.5102
Años de evolución	NA	9.636 \pm 1.4054
Escala motora UHDRS	2.000 \pm 1.8257	64.667 \pm 6.6248***
Repeticiones CAG	41.714 \pm 1.2182	45.067 \pm 2.0037
Estadios de la enfermedad		
I-II	7	4
III-IV	0	9
V	0	11
Capacidad funcional total (TFC)	13.000 \pm 0.0000	3.958 \pm 0.9515***

UHDRS fue significativamente mayor en el grupo sEH comparado con el grupo aEH ($P <$

0.001). Además, la puntuación de la Capacidad Total Funcional (Total Functional Capacity, TFC) fue significativamente menor en el grupo sEH ($P < 0.001$) respecto al grupo aEH.

Concentración plasmática de lípidos peroxidados y lactato

La concentración plasmática de LPO puede verse afectada por la concentración de lípidos

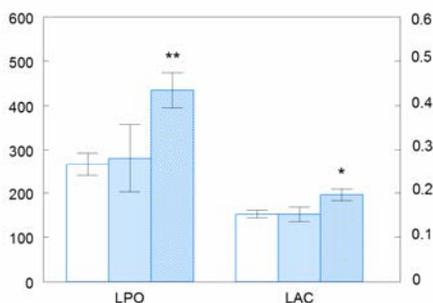


Figura 1. Concentraciones plasmáticas de LPO y LAC. Representación de la media \pm SEM de las concentraciones plasmáticas de LPO (eje izquierdo) y LAC (eje derecho) en los grupos de estudio. La concentración plasmática de LPO se expresa en nmol/ml y la de LAC en g/L. Las barras blancas representan el grupo control, las barras azules el grupo aEH y las barras rayadas el grupo sEH.

(Figura modificada de Duran et al., 2010. *J Neural Transm* 117: 325-332)

circulantes, como el colesterol y los triglicéridos. Por ello, se analizó el perfil lipídico de cada grupo, no encontrándose diferencias significativas (datos no mostrados).

Las concentraciones de LPO ($P < 0.01$) y de LAC ($P < 0.05$) fueron significativamente elevadas en el grupo sEH comparadas con el grupo control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos aEH y control. Además, el grupo sEH mostró mayores concentraciones de LPO y LAC que el grupo aEH, aunque las diferencias no alcanzaron la significación, debido posiblemente al número reducido de sujetos en el grupo aEH (Figura 1). Por otra parte, no se encontraron correlaciones significativas para ambos grupos de EH entre las concentraciones plasmáticas de LPO y LAC y la duración de la enfermedad, número de tripletes CAG, puntuación de la escala motora UHDRS, puntuación TFC o estadio de la enfermedad.

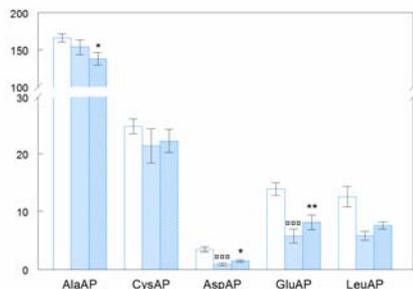


Figura 2. Actividad plasmática de las aminopeptidasas. Representación de la media \pm SEM de la actividad plasmática de la Ala-, Cys-, Asp-, Glu- y LeuAP expresada en picomol del sustrato correspondiente aminoacil- β -naftilamida hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína. Las barras blancas representan el grupo control, las barras azules el grupo aEH y las barras rayadas el grupo sEH.

(Figura modificada de Duran et al., 2010. *J Neural Transm* 117: 325-332)

Actividad plasmática de las aminopeptidasas

Las actividades APs fueron significativamente más bajas para la Ala- ($P < 0.05$), Asp- ($P < 0.05$) y GluAP ($P < 0.01$) en el grupo sEH y para la Asp- ($P < 0.001$) y GluAP ($P < 0.01$) en el grupo aEH, al comparar ambos frente al grupo control. No obstante, al comparar los dos grupos EH, no se encontraron diferencias significativas en ninguna actividad de las APs (Figura 2).

Electroforesis no desnaturizante y western blot

La figura 3a muestra un blot de AlaAP, mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes, de plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos control y sEH en cuatro ensayos diferentes (I-IV). La

intensidad de cada banda es proporcional a la actividad enzimática. De izquierda a

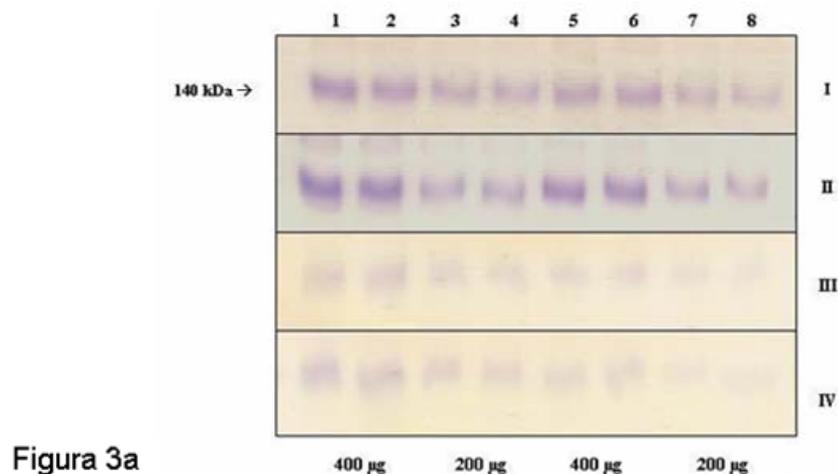


Figura 3a

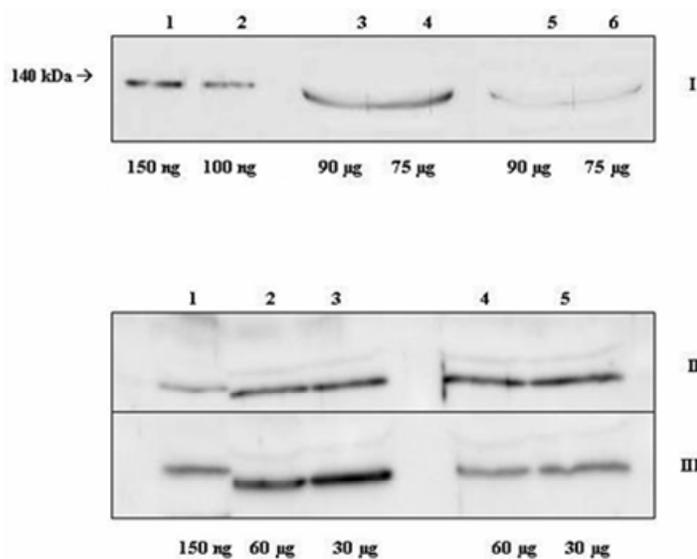


Figura 3b

Figura 3a – Blots de la Alanina-AP tras electroforesis no desnaturalizante

Blots de la Ala-AP en cuatro ensayos diferentes (I-IV) tras la separación por electroforesis no desnaturalizante de 400 y 200 microgramos en duplicado de proteínas plasmáticas de un sujeto control (bandas 1-4) y un sujeto sEH (bandas 5-8).

Figura 3b – Western blots de la Alanina-AP

Western blots de la AlaAP en tres ensayos diferentes: I-AlaAP detectada en 90 y 75 microgramos de proteínas plasmáticas de un sujeto control (bandas 3, 4) y un sujeto sEH (bandas 5, 6). II y III- AlaAP detectada en 60 y 30 microgramos de proteínas plasmáticas de un sujeto control (bandas 2, 3) y un sujeto sEH (bandas 4, 5).

(Figura modificada de Duran et al., 2010. *J Neural Transm* 117: 325-332)

derecha las cuatro primeras bandas corresponden a la actividad de la enzima AlaAP presente en 400 y 200 µg de muestra, por duplicado, de proteínas plasmáticas de un sujeto del grupo control. Las cuatro siguientes bandas corresponden a la actividad de AlaAP, en las mismas cantidades, de muestra de un paciente con sEH. La actividad AlaAP fue menor en el sujeto sEH que en el control.

La figura 3b muestra un western blot de AlaAP, en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos control y sEH en tres ensayos diferentes (I-III). Ensayo I: de izquierda a derecha las dos

primeras bandas corresponden a 150 y 100 ng, respectivamente, de AlaAP comercial con un peso molecular de 140kDa. Las dos siguientes corresponden a la AlaAP presente en 90 y 75 µg, respectivamente, de proteínas plasmáticas de un sujeto control. Las dos últimas corresponden a la AlaAP en la misma cantidad de muestra en un sujeto sEH. Ensayos II y III: de izquierda a derecha la primera banda corresponde a 150 ng de AlaAP comercial con un peso molecular de 140kDa. Las dos siguientes corresponden a la AlaAP presente en 60 y 30 µg, respectivamente, de proteínas plasmáticas de un sujeto control. Las dos últimas corresponden a la AlaAP en la misma cantidad de muestra en un sujeto sEH. A excepción del ensayo II, la concentración de la AlaAP fue menor en el sujeto sEH que en el control.

Discusión

En la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas, como EA, EP, y EH, se comparten algunos mecanismos moleculares que van a conducir a la muerte neuronal. Existen claras evidencias de la contribución de fenómenos tales como el estrés oxidativo [7], disfunción mitocondrial [2] y agregación proteica [8] en los procesos neurodegenerativos.

El cerebro es particularmente sensible a los fenómenos de estrés oxidativo debido al elevado contenido lipídico y a los grandes requerimientos energéticos. Junto a la presencia de radicales libres, la alteración del metabolismo proteico está considerada como otro de los factores patológicos responsables de la EH [9, 10]. Sin embargo, existen pocos estudios de las alteraciones específicas que ocurren en sangre periférica de enfermos de Huntington. Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la concentración plasmática de LPO en el grupo sEH respecto al grupo control, pero no en el grupo aEH, sugiriendo que el estrés oxidativo no es evidente en estadios tempranos, pero va incrementándose con la progresión de la enfermedad. Otros autores también han evaluado el papel de los fenómenos de estrés oxidativo en la EH. Chen y cols [11] encontraron un aumento del estrés oxidativo en plasma de pacientes con EH, con mayores valores en los individuos con patología motora más severa que la de los pacientes de este estudio. Por otra parte, Klepac y cols [12] describieron un aumento significativo en la concentración plasmática de LPO y un descenso significativo en la concentración de glutatión reducido en enfermos de Huntington comparados con sujetos sanos, siendo estos resultados similares en pacientes asintomáticos. Sería interesante realizar un estudio con una población mayor de enfermos asintomáticos, portadores del gen mutado, para evaluar la importancia del estrés oxidativo antes de la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad.

Junto al estrés oxidativo, los defectos en el metabolismo energético están presentes en la EH [13]. Se ha detectado un metabolismo reducido de la glucosa en la corteza cerebral y ganglios basales de pacientes con EH [9], así como alteraciones en los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial [14]. Cuando se desacopla el transporte electrónico en la cadena respiratoria, la producción de ATP disminuye y con él las defensas antioxidantes, aumentando la concentración de radicales libres [15]. La disrupción del metabolismo aeróbico promueve la formación de ácido láctico o LAC fuera de la mitocondria, a partir de piruvato, reduciendo el aporte energético [16]. Por tanto, la determinación plasmática de LAC puede ser considerada un marcador útil de disfunción mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas [17]. Nuestros resultados mostraron un aumento significativo en la concentración plasmática de LAC en el grupo sEH respecto al grupo control. Sin embargo, las concentraciones de LAC fueron similares entre los grupos aEH y control. Estos resultados siguen el mismo patrón que el obtenido para los LPO, sugiriendo que ambos fenómenos, estrés oxidativo y disfunción

mitocondrial, ocurren simultáneamente en la EH, contribuyendo cada uno al desarrollo del otro. Otros autores también han analizado la concentración de lactato como marcador de disfunción mitocondrial. Jenkins y cols [18] detectaron picos elevados de LAC en la corteza occipital de pacientes sintomáticos de EH usando Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Harms y cols [19], utilizando la misma técnica, encontraron concentraciones elevadas de lactato en la corteza frontal de 8 entre 17 pacientes sintomáticos de EH, y 4 sobre 4 pacientes asintomáticos de EH, pero no en individuos sanos. Por último, un estudio más reciente mostró mayores ratios LAC/creatina y LAC/N-acetil-asparatato en las regiones parieto-occipital y cerebelar de pacientes con EH [20].

Otra característica patológica de la EH es la alteración del metabolismo proteico. Por ello, analizamos las actividades plasmáticas de un grupo de enzimas relacionadas con el metabolismo peptídico, muy abundantes en el cerebro, las APs. Nuestro estudio mostró una reducción general de la actividad AP en ambos grupos de EH, siendo significativa para la Ala-, Asp- y GluAP en el grupo sEH, y para la Asp- y GluAP en el grupo aEH. Además, la actividad AlaAP fue similar entre los grupos aEH y control; sin embargo, no mostró diferencias significativas respecto a la actividad del grupo sEH, probablemente debido al número reducido de pacientes asintomáticos transportadores del gen mutado. Hay pocos estudios sobre el papel de las APs en las enfermedades neurodegenerativas y particularmente sobre su contribución en la patología de la EH. Butterworth [21] detectó menor actividad enzimática en tres peptidasas (enzima que convierte angiotensina, metalopeptidasa análoga a la termolisina y AlaAP) del núcleo caudado de pacientes con EH. Estas enzimas están implicadas en la activación y metabolismo de encefalinas y sustancia P [22]. Es posible, por tanto, que la reducción de sus actividades esté relacionada con el descenso en las concentraciones de encefalinas, dinorfinas y sustancia P observado en pacientes con EH [23, 24]. La AlaAP participa en la hidrólisis de los neuropéptidos metionina- y leucina-encefalina, regulando las concentraciones de ligando para los receptores opioides. La activación de estos receptores conducen a la inhibición de la enzima adenilato ciclasa y consecuentemente a la reducción de AMPc [25]. Además, las APs están implicadas en la activación del sistema renina-angiotensina (RAS, del inglés renin-angiotensin system), cuya función principal es regular la presión sanguínea y la homeostasis en el cerebro [26]. La AlaAP y la GluAP son responsables de la producción de angiotensina III (Ang III) y Ang IV, respectivamente, a partir del decapeptido inactivo Ang I. Diversos estudios han demostrado que la Ang II y Ang IV promueven la liberación de dopamina en el núcleo estriado de ratas [27, 28]. Mota y cols [29] detectaron niveles elevados de GluAP en ganglios basales humanos y sugirieron que esta enzima podría participar en la conversión de Ang II-Ang III así como en el control de la liberación de dopamina. En base a estos resultados, es posible que los mecanismos regulados por estas APs estén también dañados en la EH. No obstante, es necesario un estudio más profundo de ello para evaluar el papel exacto de las APs en la patogénesis de la EH.

Por último, los agregados intracelulares de htt constituyen el marcador patológico característico de la EH [30]. La htt mutada altera la función mitocondrial y promueve la formación de radicales libres [2, 31]. El estrés oxidativo generado podría dañar al proteosoma, bien aumentando el número de proteínas dañadas o reduciendo la producción de ATP. Sin embargo, aun no está claro el papel de los agregados de htt en la muerte celular. Algunos estudios *in vitro* han determinado que la toxicidad de la htt se debe a los pequeños fragmentos procedentes de la degradación incompleta de la proteína en el protosoma, más que a la formación de los agregados intracelulares [32]. Por otra parte, Bhutani y cols [33] demostraron que la AlaAP es la principal enzima capaz de metabolizar los fragmentos de poli-

Q de la htt liberados por el proteosoma. Por tanto, la deficiencia de este proceso promovería la formación de inclusiones citosólicas. Es posible, que la reducción de la actividad AlaAP encontrada en los pacientes con EH esté relacionada con la alteración del metabolismo proteico. Esto indicaría, que a la etiología de la EH, además de la htt, contribuyen otras alteraciones del metabolismo proteico, como los cambios detectados en la actividad enzimática de las APs. Nuestros resultados sugieren que esta reducción de la actividad AP podría estar ligada al proceso neurodegenerativo de la EH. Por ello, la actividad AP plasmática puede ser considerada como un marcador diagnóstico en la EH.

Conclusiones

Este estudio demuestra la presencia de marcadores de estrés oxidativo y la alteración de la actividad AP en el plasma de enfermos de Huntington. Las concentraciones plasmáticas de LPO y LAC fueron elevadas en enfermos sintomáticos, mientras que la actividad AP fue reducida en ambos grupos de EH, sintomáticos y asintomáticos. Estos cambios podrían estar relacionados con la progresión de la enfermedad. Por tanto, un tratamiento útil para la EH debería incluir una terapia encaminada a reducir el estrés oxidativo y normalizar la actividad AP.

Métodos

Sujetos de estudio y obtención de plasma sanguíneo

Se crearon tres grupos de estudio: uno formado por 24 enfermos sintomáticos de EH (grupo sEH), otro por 7 individuos asintomáticos portadores del gen mutado para esta enfermedad (grupo aEH), y un grupo control formado por 60 individuos sanos de igual distribución en edad y sexo (grupo C). El diagnóstico de la EH se llevó a cabo por al menos dos neurólogos, basado en las características clínicas específicas de la enfermedad en individuos con historia familiar y análisis genético positivo. La evaluación de los síntomas se realizó mediante entrevista clínica y exploración neurológica, siguiendo los criterios de la Escala Unificada de la Enfermedad de Huntington (Unified Huntington's Disease Rating Scale, UHDRS) [34]. Todos los enfermos sintomáticos estuvieron bajo tratamiento en la Unidad de Trastornos del Movimiento del Hospital Universitario San Cecilio. Los individuos asintomáticos fueron definidos como sujetos con un número caracterizado de repeticiones CAG (≥ 38) en el gen de la htt sin síntomas clínicos evidentes de EH. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción en la vena cubital y se almacenaron en tubos con EDTA. El ADN fue analizado en el Servicio de Bioquímica Clínica de nuestro hospital, según el método descrito por Blanco y cols [35]. El plasma fue aislado por centrifugación durante 15 minutos a 3000 r.p.m. y almacenado a -80°C hasta su uso.

Determinación de las concentraciones plasmáticas de lípidos peroxidados y lactato

Como marcadores de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial se midieron las concentraciones plasmáticas de lípidos peroxidados (LPO) y lactato (LAC) mediante los kits "PeroxiDetect" (Sigma) y "L-lactic acid Enzymatic Bio-analysis" (Roche), respectivamente, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las muestras se analizaron en duplicado, y los resultados se expresaron como nanomoles de LPO por mililitro (nmol/ml) y gramo de LAC por litro (g/L)

Análisis de la actividad enzimática de las Aminopeptidasas

Las actividades plasmáticas de la alanina- (AlaAP), cistina- (CysAP), aspartato- (AspAP), glutamato- (GluAP) y leucina- (LeuAP) aminopeptidasa se analizaron en duplicado mediante ensayo fluorimétrico según el método descrito previamente [36]. Cada actividad aminopeptidasa se expresó como picomoles de Ala-, Cys-, Asp-, Glu- y Leu- β -naftilamida hidrolizada por minuto y miligramo de proteína.

Electroforesis no desnaturalizante y western-blot

La actividad enzimática de la AlaAP fue analizada mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, con la separación de 400 y 200 microgramos de proteínas plasmáticas en gel de acrilamida al 10%, y la posterior incubación con el sustrato específico de la enzima Ala- β -naftilamida en buffer fosfato 0.1M (pH 6.1) y sal Fast Black K (FBK) a 37°C durante 30 minutos. Con la hidrólisis del sustrato se libera β -naftilamina que reacciona con la sal FBK produciendo una banda color púrpura que se corresponde con la localización de la AP, siendo la intensidad de color proporcional a su actividad enzimática.

Los análisis de western blot se llevaron a cabo para determinar la expresión de la AlaAP en plasma. Previo a la electroforesis, las muestras fueron purificadas de albúmina e

Inmunoglobulina G plasmáticas mediante columnas de inmutafinidad siguiendo las instrucciones del kit (SIGMA). A continuación las proteínas plasmáticas se separaron en gel de acrilamida al 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio Rad). La membrana fue bloqueada con solución buffer fosfato (PBS), en presencia de 0.1% de tween 20 y 5% de leche desnatada, a 4^o C durante toda la noche. Posteriormente se incubó con el anticuerpo específico CD13/AlaAP (Santa Cruz Technologies) a dilución 1/1000 en solución PBS con 0.1% de tween 20 y 0.5% de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS/tween, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario anti-IgG unido a HRP en las mismas condiciones. Finalmente, se volvió a lavar y se procedió al revelado de los blots utilizando la solución ECL-plus, según las indicaciones del fabricante, y el sistema revelador Curix 60 (AGFA).

Análisis estadístico

La diferencia entre grupos fue analizada mediante ANOVA de una vía en cada una de las variables estudiadas. En aquellas comparaciones que alcanzaron significación, se realizaron comparaciones por parejas post hoc, con la penalización de Bonferroni. La homogeneidad de varianzas se alcanzó mediante la transformación del logaritmo neperiano. La t de Student fue empleada para comparar medias entre grupos y los análisis de asociación se llevaron a cabo mediante el empleo del coeficiente de correlación de Pearson. El paquete estadístico utilizado fue STATA 10.1 y los contrastes se dieron significativos con un valor de P igual o inferior a 0.05. Todos los resultados se expresaron como media \pm SEM.

Contribución de los Autores

Francisco Vives: Concepción del trabajo de investigación, redacción y revisión del manuscrito. *Blas Morales*: Selección y valoración clínica de los pacientes. *Raquel Duran*: Ejecución del trabajo de investigación y redacción del manuscrito. *Francisco J. Barrero*: Selección y valoración clínica de los pacientes. *Juan D. Luna*: Diseño y ejecución del análisis estadístico. *Manuel Ramírez*: Revisión y crítica del manuscrito.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Junta de Andalucía por la financiación al grupo PAI CTS 438 y a la Universidad de Granada por el contrato de investigación otorgado a Raquel Duran. Además, agradecen la contribución del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Clínico San Cecilio al análisis de lípidos y genética de los sujetos analizados.

Referencias

1. Petrasch-Parwez E, Nguyen H, Löbbecke-Schumacher M, Habbes HW, Wieczorek S, Riess O, Andres KH, Dermietzel R, Von Hörsten S: **Cellular and subcellular localization of huntington aggregates in the brain of a rat transgenic for Huntington's disease.** *J Comp Neurol* 2007, **501**:716-730.
2. Trushina E, McMurray CT: **Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases.** *Neuroscience* 2007; **145**:1233-1248.
3. Pérez-Severiano F, José-Segovia CR: **Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease.** *Brain Res* 2000, **862**:234-237.
4. Li SH, Li XJ: **Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington's disease.** *Mol Neurodegener* 2006, **1**:19-29.
5. Sayre LM, Perry G, Smith MA: **Oxidative stress and neurotoxicity.** *Chem Res Toxicol* 2008, **21**:172-188.
6. Mitsui T, Nomura S, Itakura A, Mizutani S: **Role of aminopeptidases in the blood pressure regulation.** *Biol Pharm Bull* 2004, **27**:768-771.
7. Andersen JK: **Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?** *Nat Rev Neurosci* 2004, **5**: S18-S25.
8. Spires TL, Hannan AJ: **Molecular mechanisms mediating pathological plasticity in Huntington's disease and Alzheimer's disease.** *J Neurochem* 2007, **100**:874-882.
9. Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF: **Oxidative stress in Huntington's disease.** *Brain Pathol* 1999, **9**:147-163.
10. Saft C, Zange J, Andrich J, Müller K, Lindenberg K, Landwehrmeyer B, Vorgerd M, Kraus PH, Przuntek H, Schöls L: **Mitochondrial impairment in patients and asymptomatic mutations carriers of Huntington's disease.** *Mov Disord* 2005, **20**:674-679.
11. Chen CM, Wu YR, Cheng ML, Liu JL, Lee YM, Le PW, Soong BW, Chiu DTY: **Increased oxidative damage mitochondrial abnormalities in the peripheral blood of Huntington's disease patients.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **359**:335-340.
12. Klepac N, Relja M, Klepac R, Hecimovic S, Babic T, Trkulja V: **Oxidative stress parameters in plasma of Huntington' disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects.** *J Neurol* 2007, **254**:1676-1683.
13. Grünewald T, Beal MF: **Bioenergetics in Huntington's disease.** *Ann NY Acad Sci* 1999, **893**:203-213.
14. Gu M, Gash MT, Mann VM, Javay-Agid F, Cooper JM, Schapira AHV: **Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus.** *Ann Neurol* 1996, **39**:386-389.
15. Schapira A: **Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease.** *Lancet Neurol* 2008, **7**:97-109.
16. Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G: **Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress.** *J Neurosci Res* 2005, **79**:240-247.
17. Finsterer J: **Lactate stress testing in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.** *Int J Neurosci* 2005, **115**:583-591.
18. Jenkins BC, Koroshetz WJ, Beal MF, Rosen BR: **Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington disease using localized 1H NMR spectroscopy.** *Neurology* 1993, **43**:2689-2695.
19. Harms L, Meierkord H, Timm G, Pfeiffer L, Ludolph AC: **Decreased N-acetyl-aspartate/choline ratio and increased lactate in the frontal lobe of patients with**

- Huntington' disease group: a proton magnetic resonance spectroscopy study.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997, **62**:27-30.
20. Martin WR, Wieler M, Hanstock CC: **Is brain lactate increased in Huntington's disease?** *J Neurol Sci* 2007, **263**:70-74.
 21. Butterworth J: **Changes in nine enzyme markers for neurons, glia and endothelial cells in agonal state and Huntington's disease caudate nucleus.** *J Neurochem* 1986, **47**:583-587.
 22. Hui K: **Brain-specific aminopeptidase: from enkephalinase to protector against neurodegeneration.** *Neurochem Res* 2007, **32**:2062-2071.
 23. Dawbarn D, Zamir N, Waters ZM, Hunt SP, Emson PC, Brownstein MJ: **Peptides derived from prodynorphin are decreased in basal ganglia of Huntington's disease brains.** *Brain Res* 1986, **372**:155-158.
 24. Iadarola MJ, Mouradian MM: **Decrease in a proenkephalin peptide in cerebrospinal fluid in Huntington's disease and progressive supranuclear palsy.** *Brain Res* 1989, **479**:397-401.
 25. Potolicchio I, Carven GJ, Xu S, Stipp C, Riese RJ, Stern LJ, Santambrogio L: **Proteomic analysis of microglia-derived exosomes. Metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism.** *J Immunol* 2005, **174**:2237-2243.
 26. Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Segarra AB, Hermoso F, Duran R, Ramírez M: **Brain aminopeptidases and hypertension.** *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006, **7**:129-134.
 27. Mendelshon FA, Jenkins TA, Berkevic SF: **Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats.** *Brain Res* 1993, **613**:221-229.
 28. Stragier B, Sarre S, Vanderheyden P, Vauquelin G, Fournie-Zaluski MC, Ebinger G, Michotte Y: **Metabolism of angiotensin II is required for its in vivo effect on dopamine release in the striatum of the rat.** *J Neurochem* 2004, **90**:1251-1257.
 29. Mota N, Iturrioz X, Claperon C, Bodineau L, Fassot C, Roques BP, Palkovits M, Llorens-Cortes C: **Human brain aminopeptidase A: biochemical properties and distribution in brain nuclei.** *J Neurochem* 2008, **106**:416-428.
 30. Walker FO: **Huntington's disease.** *Lancet* 2007, **369**:218-228.
 31. Goswami A, Dikshit P, Mishra A, Mulherkar S, Nukina N, Jana NR: **Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **342**:184-190.
 32. Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S: **Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death.** *Nature* 2004, **431**:805-810.
 33. Bhutani N, Venkatraman P, Goldberg AL: **Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation.** *EMBO J* 2007, **26**:1385-1396.
 34. Huntington Study Group: **Unified Huntington's disease rating scale: reliability and consistency.** *Mov Disord* 1996, **11**:136-142.
 35. Blanco S, Suarez A, Gandia-Pla S, Gómez-Llorente C, Antúnez A, Gómez-Capilla JA, Fárez-Vidal E: **Use of capillary electrophoresis for accurate determination of CAG repeats causing Huntington' disease. An oligonucleotide design avoiding shadow bands.** *Scand J Clin Lab Invest* 2008, **68**:577-584.
 36. Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, Duran R, Segarra AB, de Gasparo M, Ramírez M: **Plasma aminopeptidase activities in rats, after left and right intrastriatal administration of 6-hidroxydopamine.** *Neuroendocrinology* 2004, **80**:219-224.



ENCUENTROS EN NEUROCIENCIAS VOL. I
JIMÉNEZ DÍAZ L. & NAVARRO LÓPEZ J.D. (eds.)