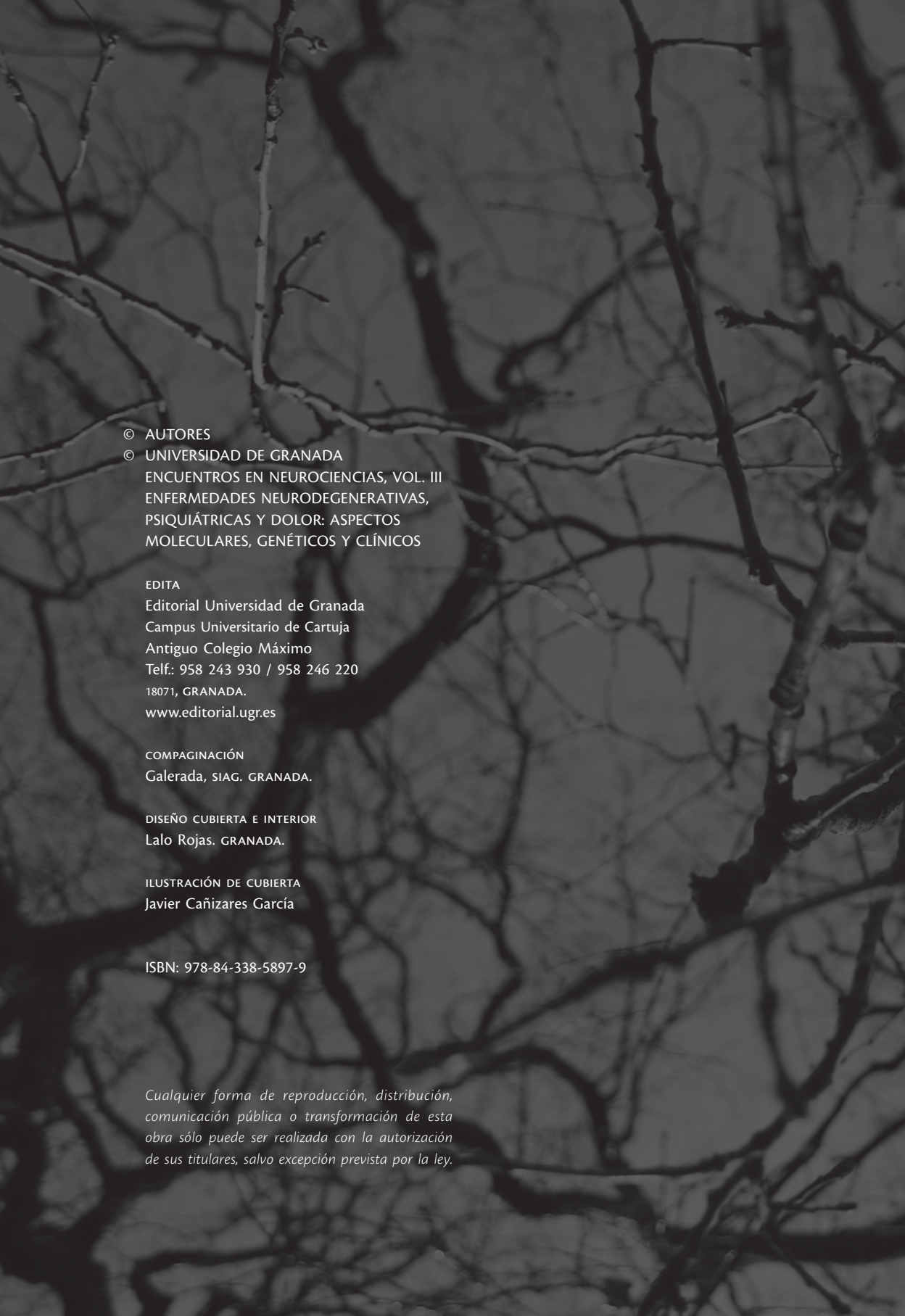


Enfermedades neurodegenerativas, psiquiátricas y dolor: aspectos moleculares, genéticos y clínicos

Editores:

Montes Ramírez, M.^a I. Rosa
García Leiva, Juan Miguel
Durán Ogalla, Raquel

Encuentros en Neurociencias, vol. III

- 
- © AUTORES
© UNIVERSIDAD DE GRANADA
ENCUENTROS EN NEUROCIENCIAS, VOL. III
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS,
PSIQUIÁTRICAS Y DOLOR: ASPECTOS
MOLECULARES, GENÉTICOS Y CLÍNICOS

EDITA
Editorial Universidad de Granada
Campus Universitario de Cartuja
Antiguo Colegio Máximo
Telf.: 958 243 930 / 958 246 220
18071, GRANADA.
www.editorial.ugr.es

COMPAGINACIÓN
Galerada, SIAG. GRANADA.

DISEÑO CUBIERTA E INTERIOR
Lalo Rojas. GRANADA.

ILUSTRACIÓN DE CUBIERTA
Javier Cañizares García

ISBN: 978-84-338-5897-9

*Cualquier forma de reproducción, distribución,
comunicación pública o transformación de esta
obra sólo puede ser realizada con la autorización
de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley.*

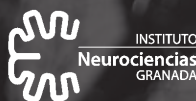
Encuentros en Neurociencias, vol. III

Enfermedades neurodegenerativas, psiquiátricas y dolor: aspectos moleculares, genéticos y clínicos

Editores

Montes Ramírez, M.^a I. Rosa
García Leiva, Juan Miguel
Durán Ogalla, Raquel

Granada 2015



eug



Índice

Relación de coautores	xi
Prólogo	xv
CAPÍTULO 1. Genética de la enfermedad de Parkinson: Una actualización. BANDRÉS-CIGA S, DURÁN R, BARRERO FJ, ESCAMILLA-SEVILLA F, PELEGRINA J, RAMÍREZ M, VIVES F.	1
CAPÍTULO 2. MGMT y CD133 como biomarcadores pronósticos en pacientes con glioblastoma tratados con temozolamida y radioterapia. OLIVER JA, MELGUIZO C, ORTIZ R, ÁLVAREZ P, RODRÍGUEZ F, PRADOS J.	19
CAPÍTULO 3. Influencia de la proteína MGMT y el sistema de reparación de errores MMR en la resistencia al tratamiento con TMZ en pacientes con Glioblastoma Multiforme. PERAZZOLI G, ORTIZ R, PRADOS J, ÁLVAREZ PJ, CABA O, CABEZA L, MELGUIZO C.	37
CAPÍTULO 4. Células madre mesenquimales de tejido adiposo: obtención, caracterización y diferenciación neurogénica. JIMÉNEZ-LUNA C, PRADOS J, BERDASCO M, VÉLEZ C, RAMA AR, MELGUIZO C.	47
CAPÍTULO 5. Evidencia genética desde un estudio epidemiológico de la implicación de los sistemas HHA y serotoninérgico en el origen de la depresión mayor. CHING-LÓPEZ A, RIVERA M, CERVILLA J, MCKENNEY K, MOLINA E, GUTIÉRREZ B.	59
CAPÍTULO 6. Factores asociados a la ideación suicida en pacientes con fibromialgia. LAFUENTE C, PITA-CALANDRE E, SALGUEIRO M, GARCÍA-LEIVA JM.	79

CAPÍTULO 7. Comparison between a gluten-free diet versus a hypocaloric diet among patients with fibromyalgia experiencing gluten sensitivity symptoms: Preliminary results of a pilot, open-label, randomized clinical trial. SLIM M, MOLINA-BAREA R, GARCÍA-LEIVA JM, RODRÍGUEZ-LÓPEZ CM, MORILLAS-ARQUÉS P, RICO-VILLADEMOROS F, PITA-CALANDRE E.	95
CAPÍTULO 8. Analysis of the questionnaires LANSS, DN4 and brief pain inventory (BPI) in the detection and evaluation of peripheral neuropathic pain. HAMDAN A, LUNA JD, GÁLVEZ R, DEL POZO E.	111
CAPÍTULO 9. Evaluación de la eficacia de la electroacupuntura en pacientes con dolor crónico por radiculopatía lumbar. GUTIÉRREZ LOMAS V, CABALLERO MD, DEL POZO E, GÁLVEZ R.	133
CAPÍTULO 10. Efecto modulador del estrés social: diferencias entre dolor visceral y somático. GONZÁLEZ-CANO R, VINCENT K, COBOS EJ, CODERRE TJ, BAEYENS JM, CERVERÓ F, PITCHER MH.	151
CAPÍTULO 11. Diferencias de la analgesia opioide periférica frente a estímulos térmicos y mecánicos. MONTILLA-GARCÍA A, SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ C, COBOS EJ, BAEYENS JM.	161
CAPÍTULO 12. Papel de los receptores sigma-1 en la analgesia opioide periférica. SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ C, MONTILLA-GARCÍA A, GONZÁLEZ-CANO R, NIETO FR, ROMERO L, ARTACHO-CORDÓN A, MONTES R, BAEYENS JM, ENTRENA JM, COBOS EJ.	175
CAPÍTULO 13. Modulación de la hiperalgesia inflamatoria por los receptores sigma-1 periféricos. TEJADA MA, MONTILLA-GARCÍA A, SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ C, ENTRENA JM, PERAZZOLI G, BAEYENS JM, COBOS EJ.	193
CAPÍTULO 14. Mecanismos moleculares implicados en la formación de la memoria de reconocimiento gustativa. GÓMEZ-CHACÓN B, GALLO M.	209
CAPÍTULO 15. Estado del neurodesarrollo en niños nacidos de madres con sobrepeso, obesidad y diabetes gestacional, durante los primeros 18 meses de vida. TORRES-ESPÍNOLA FJ, JEREZ CALERO A, SEGURA MT, MORENO-TORRES R, PADILLA C, ROBLES C, CRUZ-QUINTANA F, PÉREZ-GARCÍA M, CAMPOY C.	225

CAPÍTULO 16. El polimorfismo materno PPARG Pro12Ala se asocia con el desarrollo neurológico del bebé a los 18 meses de edad.	245
TORRES-ESPÍNOLA FJ, ALTMÄE S, SEGURA MT, JEREZ A, ANJOS T, CHISAGUANO M, LÓPEZ-SATABER MC, ENTRALA C, ALVAREZ JC, AGIL A, FLORIDO J, CATENA A, PÉREZ-GARCÍA M, CAMPOY C.	
CAPÍTULO 17. Efecto preventivo de ketamina intraoperatoria sobre el dolor postoperatorio en cirugía laparoscópica con Anestesia Total Intravenosa.	261
GARCÍA-HENARES JF, MORALES C, MONTES R.	
CAPÍTULO 18. ERGmf en pacientes de enfermedades autoinmunes sistémicas tratados con hidroxicloroquina.	273
SÁEZ-MORENO JA, KTIRI N, RODRÍGUEZ-FERRER JM.	
CAPÍTULO 19. Tratamiento de la espasticidad en la parálisis cerebral infantil.	289
IBÁÑEZ-MARTÍNEZ S, RODRÍGUEZ-FERRER JM.	



Relación de coautores

- Agil A.** Instituto de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica (CIBM), y Departamento de Farmacología. Universidad de Granada.
- Altmäe S.** Departamento de Pediatría. Universidad de Granada.
- Álvarez PJ.** Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), CIBM. Universidad de Granada.
- Álvarez JC.** Departamento de Medicina Legal. Universidad de Granada.
- Anjos T.** Centro de Excelencia de Investigación Pediátrica (EURISTIKOS). Universidad de Granada.
- Artacho-Cordón A.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Farmacología. Universidad de Granada.
- Baeyens JM.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Farmacología. Universidad de Granada.
- Bandrés-Ciga S.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Fisiología. Universidad de Granada.
- Barrero FJ.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Medicina. Universidad de Granada. Servicio de Neurología, Unidad de Trastornos del Movimiento. Hospital Universitario San Cecilio, Granada.
- Berdasco M.** Programa de Epigenética y Biología del Cáncer (PEBC). Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Barcelona.
- Caba O.** IBIMER, CIBM, Universidad de Granada. Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén.
- Caballero MD.** Unidad del Dolor. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.
- Cabeza L.** IBIMER, CIBM, y Departamento de Anatomía y Embriología humana. Universidad de Granada.
- Campoy C.** EURISTIKOS, CIBM, y Departamento de Pediatría. Universidad de Granada. Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto Carlos III.
- Catena A.** Centro de Investigación Mente, Cerebro y Comportamiento (CIMCYC), y Departamento de Psicología Experimental. Universidad de Granada.

-
- Cerveró F.** The Alan Edwards Centre for Research on Pain. McGill University. Montreal (Quebec), Canadá.
- Cervilla JA.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Psiquiatría. Universidad de Granada. Instituto de Investigación Biosanitaria, ibs-Granada. Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto Carlos III.
- Ching-López A.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada. CIBERSAM, Instituto Carlos III.
- Chisaguano M.** Centro de Investigación Biomédica en Red de Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador.
- Cobos EJ.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Farmacología. Universidad de Granada
- Coderre TJ.** The Alan Edwards Centre for Research on Pain. McGill University. Montreal (Quebec), Canadá.
- Cruz-Quintana F.** CIMCYC, y Departamento de Personalidad, Evaluación y Tratamiento Psicológico. Universidad de Granada.
- del Pozo E.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Farmacología. Universidad de Granada.
- Durán R.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Fisiología. Universidad de Granada.
- Entrala C.** Lorgen Genómica y Proteómica. BIC, Parque Tecnológico de la Salud. Universidad de Granada.
- Entrena JM.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Unidad de Análisis de Comportamiento Animal, Centro de Instrumentación Científica. Universidad de Granada.
- Escamilla-Sevilla F.** Servicio de Neurología, Unidad de Trastornos del Movimiento. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. Instituto de Investigación Biosanitaria, ibs-Granada.
- Florido J.** Departamento de Obstetricia y Ginecología. Universidad de Granada.
- Gallo M.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Psicobiología. Universidad de Granada.
- Gálvez R.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada. Unidad del Dolor. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.
- García-Henares JF.** Servicio de Anestesia. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.
- García-Leiva JM.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada.
- Gómez-Chacón B.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Psicobiología. Universidad de Granada.
- González-Cano R.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Farmacología. Universidad de Granada.
- Gutiérrez B.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Psiquiatría. Universidad de Granada. CIBERSAM, Instituto Carlos III.
- Gutiérrez Lomas V.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada. Unidad del Dolor. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

- Hamdan A.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada. Unidad del Dolor. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.
- Ibáñez Martínez S.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada.
- Jerez-Calero A.** Departamento de Pediatría, Universidad de Granada.
- Jiménez-Luna C.** IBIMER, CIBM. Universidad de Granada.
- Ktiri N.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada.
- Lafuente C.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada.
- López-Sabater MC.** CIBERobn, Instituto de Salud Carlos III. Departamento de Nutrición y Bromatología. Universidad de Barcelona.
- Luna JD.** Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Universidad de Granada.
- McKenney K.** CIBERSAM, Instituto Carlos III.
- Melguizo C.** IBIMER, CIBM, y Departamento de Anatomía y Embriología humana. Universidad de Granada.
- Molina E.** CIBERSAM, Instituto Carlos III.
- Molina-Barea R.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada.
- Montes R.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Fisiología. Universidad de Granada.
- Montilla-García A.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Farmacología. Universidad de Granada.
- Morales C.** Servicio de Anestesia. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada
- Moreno-Torres R.** EURISTIKOS, Universidad de Granada.
- Morillas-Arqués P.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada
- Nieto FR.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Farmacología. Universidad de Granada.
- Oliver JA.** IBIMER, CIBM. Universidad de Granada.
- Ortiz R.** IBIMER, CIBM, Universidad de Granada. Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén.
- Padilla C.** Departamento de Obstetricia y Ginecología. Universidad de Granada
- Pelegriña J.** Servicio de Neurología. Hospital Universitario San Cecilio, Granada.
- Perazzoli G.** IBIMER, CIBM. Universidad de Granada.
- Pérez-García M.** CIMCYC, y Departamento de Personalidad, Evaluación y Tratamiento Psicológico. Universidad de Granada.
- Pita-Calandre E.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada.
- Pitcher MH.** Pain and Integrative Neuroscience Branch, Division of Intramural Research, National Center for Complementary and Integrative Health (NCCIH). National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.
- Prados J.** IBIMER, CIBM, y Departamento de Anatomía y Embriología Humana. Universidad de Granada.
- Rama AR.** IBIMER, CIBM, Universidad de Granada. Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén
- Ramírez M.** Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén.
- Rico-Villademoros F.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada

-
- Rivera M.** Instituto de Neurociencias, CIBM, Universidad de Granada. CIBERSAM, Instituto Carlos III. MRC SGDP Centre, Institute of Psychiatry, Psychology & Neuroscience, King's College London. UK
- Robles C.** Departamento de Pediatría, Universidad de Granada. Servicio de Pediatría, Hospital Universitario San Cecilio, Granada.
- Rodríguez F.** IBIMER, CIBM, y Departamento de Anatomía y Embriología humana. Universidad de Granada.
- Rodríguez-Ferrer JM.** Instituto de Neurociencias CIBM, y Departamento de Fisiología. Universidad de Granada.
- Rodríguez-López CM.** Instituto de Neurociencias CIBM, Universidad de Granada. Departamento de Neurociencia y Ciencias de la Salud, Universidad de Almería.
- Romero L.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Farmacología. Universidad de Granada
- Sáez-Moreno JA.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada. Servicio de Neurofisiología Clínica, Hospital Universitario San Cecilio, Granada.
- Salgueiro M.** Departamento de Neurociencias, Facultad de Psicología. Universidad del País Vasco.
- Sánchez-Fernández C.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Farmacología. Universidad de Granada
- Segura MT.** EURISTIKOS, Universidad de Granada.
- Slim M.** Instituto de Neurociencias, CIBM. Universidad de Granada.
- Tejada MA.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Farmacología. Universidad de Granada.
- Torres-Espínola FJ.** EURISTIKOS, Universidad de Granada.
- Vélez C.** IBIMER, CIBM, y Departamento de Anatomía y Embriología Humana. Universidad de Granada.
- Vincent K.** The Alan Edwards Centre for Research on Pain. McGill University. Montreal (Quebec), Canadá.
- Vives F.** Instituto de Neurociencias, CIBM, y Departamento de Fisiología. Universidad de Granada.

Prólogo

Raquel Durán Ogalla

La Neurociencia comprende un amplio abanico de estudio dentro del cerebro, sus funciones y sus patologías. Desde el nacimiento de esta disciplina de la mano de la Teoría Neuronal de Santiago Ramón y Cajal, a finales del siglo XIX, son muchos los avances científicos que se han llevado a cabo y que han permitido un mejor conocimiento de su complejo funcionamiento. No obstante, queda aun mucho camino por recorrer, en el que sólo mediante un abordaje multidisciplinar y coordinado será posible descifrar el funcionamiento cerebral en el futuro.

Con la idea de dar a conocer a la comunidad científica y universitaria las líneas de investigación puestas en marcha en el Instituto de Neurociencias «Doctor Olóriz» de la Universidad de Granada, y gestados dentro de la celebración periódica de jornadas de difusión científica, ha surgido esta colección de libros de «Encuentros en Neurociencias».

La tónica estructural de esta obra es similar a las anteriores ediciones: los trabajos de investigación se distribuyen en diecinueve capítulos que abarcan desde investigación biomédica básica hasta investigación clínica y traslacional en el campo de la neurociencia.

Los autores, colaboradores y editores esperan con esta obra poner en conocimiento al lector del estado actual de la investigación en el sistema nervioso, y agradecerán las críticas, sugerencias y comentarios acerca de la misma, los cuales serán considerados en ediciones posteriores.



Genética de la enfermedad de Parkinson: Una actualización

**Bandrés-Ciga S, Durán R, Barrero FJ,
Escamilla-Sevilla F, Pelegrina J, Ramírez M, Vives F.**

Resumen

En las últimas dos décadas, hemos sido testigos de una revolución en el campo de la genética de la Enfermedad de Parkinson (EP), un trastorno neurodegenerativo que afecta al movimiento y cuya causa es la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra (SNpc). El descubrimiento de genes asociados a mutaciones causantes de la variedad familiar ha proporcionado nuevo conocimiento acerca de los posibles mecanismos moleculares implicados en la neurodegeneración. Por otro lado, se ha sugerido más recientemente que la EP esporádica, la forma más frecuente, podría responder a un patrón poligénico multifactorial, en el que la interacción entre genes de riesgo y la exposición a factores ambientales podría explicar en gran parte su origen.

La genética y su avanzada tecnología de secuenciación y de genotipado a gran escala están aportando luz en el esclarecimiento de la etiología de la EP, facilitando además la identificación de nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de tratamientos eficaces que permitan curar o ralentizar la neurodegeneración. Por otro lado, el hallazgo de variantes genéticas de riesgo, podría ser una potente herramienta en el diagnóstico clínico y diferencial, permitiendo tanto identificar a la población con predisposición genética a desarrollar EP como caracterizar los distintos fenotipos clínicos.

La presente revisión bibliográfica pretende dar una visión actualizada sobre la implicación de la genética en la EP, abordando con detalle los genes asociados al desarrollo de la enfermedad.

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo que afecta al movimiento, cuya causa es la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra (SNpc). Es la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor prevalencia, solo precedida por la enfermedad de Alzheimer, y la primera entre las alteraciones que afectan al movimiento. Se estima que la prevalencia mundial es de 50-200 casos por 100.000 habitantes, observándose con mayor frecuencia por encima de los 60 años, y la proporción se in-

crementa con la edad. A pesar de los considerables esfuerzos realizados, todavía no se ha logrado identificar en su totalidad los mecanismos fisiopatológicos implicados en la EP, ni cómo éstos se entrelazan conduciendo a la neurodegeneración de la SNpc. Entre los mecanismos postulados, además de los de causa genética, se encuentran la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la alteración de las rutas del proteosoma y del lisosoma, los fenómenos de agregación proteica y la neuroinflamación.

Desde que James Parkinson describiera la EP en 1817 en su tratado monográfico «*An Essay on the Shaking Palsy*» y a lo largo de la historia, las causas de la EP se habían atribuido en su totalidad a factores ambientales de origen desconocido. No fue hasta 1888 cuando las observaciones de Guillermo Gowers pusieron de manifiesto la importancia de los factores genéticos en la EP, tras comprobarse que existía una mayor prevalencia de desarrollo de la enfermedad entre los parientes de enfermos con EP [1]. No obstante, el concepto de heredabilidad ha llevado muchas veces a controversia, siendo cuestionado por investigadores de la notoriedad de William Langston, quien continuaba postulando una etiología puramente ambiental [2]. Además, investigaciones llevadas a cabo en gemelos monocigotos y dicigotos apoyaban la idea de que las principales causas de EP de inicio tardío no eran genéticas [3,4]. Sin embargo, una serie de estudios de agregación familiar en diferentes regiones geográficas del mundo aportaron nueva luz y corroboraron la hipótesis de que este trastorno neurológico presentaba un sustrato genético de marcada trascendencia [5,6]. Tanta ha sido su importancia, que en las últimas dos décadas hemos sido testigos de una revolución en la genética de la EP, siendo cada vez mayor la contribución de este campo para el conocimiento de los mecanismos que subyacen a la EP.

La EP puede presentarse en el subtipo familiar o esporádico, variedades clínicamente indistinguibles. Aunque las formas familiares solo representan entre un 5% y un 10% de los casos, su estudio es clave para descifrar la base molecular de la EP. El descubrimiento de genes asociados a mutaciones causantes de la variedad familiar ha proporcionado nuevo conocimiento acerca de los posibles mecanismos moleculares implicados en la neurodegeneración. Hasta el momento varios genes, de los cuales hablaremos posteriormente, se han reconocido como responsables de las formas mendelianas autosómicas, dominantes o recesivas. Sin embargo, las mutaciones monogénicas causantes de la variedad familiar son raras y minoritarias, ya que la gran mayoría de los afectados se corresponde con las formas esporádicas, constituyendo alrededor de un 90% de los casos. Recientemente se ha sugerido que la EP esporádica podría ser el resultado de múltiples eventos, incluyendo el envejecimiento, la susceptibilidad genética y la exposición a factores ambientales. La EP esporádica podría englobarse dentro de las llamadas enfermedades genéticamente complejas; obedecen a un patrón poligénico multifactorial en el que la interacción entre variantes genéticas de baja penetrancia y la exposición a factores ambientales explicarían su etiología.

La era de los GWAS: Estudios de asociación genética a gran escala

La secuenciación completa del genoma humano [7,8], el proyecto HapMap, creado con el fin de catalogar las regiones de similitudes y diferencias genéticas entre individuos y entender mejor la relación entre el genoma y la salud humana [9], así como el gran avance de la tecnología, han permitido el desarrollo de estudios genéticos poblacionales a gran escala, comúnmente llamados GWAS (*Genome Wide Association Study*). La finalidad de estos estudios se centra en detectar variantes genéticas de riesgo para una determinada enfermedad mediante comparación de frecuencias alélicas entre casos y controles. Esta nueva concepción metodológica ha llevado a la identificación de nuevos genes candidatos que nos han orientado hacia posibles rutas biológicas implicadas en la EP que puedan explicar tanto su origen como los distintos fenotipos clínicos, además de contribuir a nuevo conocimiento para el diseño de las tan ansiadas dianas terapéuticas que curen, prevengan o ralenticen la neurodegeneración.

Las variantes genéticas estudiadas en los GWAS son los llamados polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), es decir, variaciones en la secuencia de ADN que afectan a una sola base y que se dan en al menos un 1% de la población. Aquellos SNPs que se encuentran en exones (regiones codificantes del gen) pueden alterar la estructura y función de la proteína, mientras que los que se encuentran en intrones (regiones no codificantes) o en regiones intergénicas pueden afectar a la expresión génica contribuyendo a la aparición de la EP.

Los primeros GWAS llevados a cabo para entender la genética de la EP [10,11] se vieron obstaculizados por varios problemas. La limitación de la tecnología no hacía posible el diseño de chips con un número de variantes genéticas de estudio demasiado alto. Hasta el momento se han asociado 28 genes con la EP (revisado en [12]). Las primeras variantes genéticas de riesgo asociadas a la EP esporádica mediante GWAS, se encontraron en genes que previamente habían sido reconocidos como causantes de la EP familiar a través de estudios de ligamiento, como son: SNCA, LRRK2 y MAPT. Posteriormente un gran número de loci de riesgo fueron identificados, algunos de ellos nunca antes asociados a la EP. Hasta la fecha se han encontrado más de 20, pero por los distintos fenotipos clínicos que presenta la EP, se estima que muchos de ellos todavía están por descubrir.

Tras el éxito de estos estudios, algunos investigadores decidieron colaborar poniendo en común todos los resultados obtenidos en los distintos GWAS y así poder aumentar el poder estadístico, dando lugar a los llamados meta-análisis, todavía más eficaces a la hora de detectar variantes de riesgo. De esta manera, 3 meta-análisis fueron publicados en cuestión de meses, y cada uno de ellos identificó al menos una asociación novedosa. El Consorcio Internacional de Genómica en EP sacó a la luz el primero de ellos, incluyendo un pool con todos los datos de 5 GWAS conducidos en Europa y EEUU [11, 13-17]. 11 loci alcanzaron la sig-

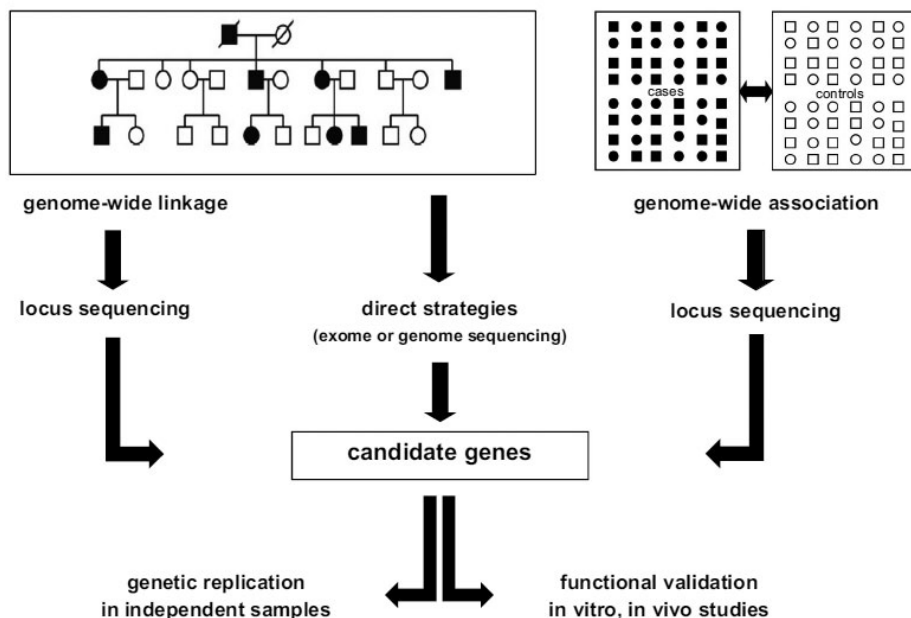


FIGURA 1. Schematic representation of the current research strategies for finding genes related to human diseases.

nificación, de los cuales 5 de ellos eran completamente novedosos. Una de las limitaciones de los GWAS llevados a cabo hasta el momento, es que la mayoría de ellos no establecen una diferenciación entre los pacientes con EP de inicio tardío y los de inicio temprano. Se piensa que aquellos individuos que desarrollan la EP a edades tempranas, son portadores de variantes genéticas con un efecto muy superior y de mayor penetrancia que el resto. Además, otro aspecto importante a tener en cuenta en el estudio es entender las interacciones intragénicas, es decir, como los loci de susceptibilidad dan lugar a un riesgo acumulativo que favorece el desarrollo de la EP esporádica.

Hoy en día, considerando los meta-análisis más recientes, no existe ningún estudio que haya sido capaz de identificar todos los loci descritos al mismo tiempo, por lo que o bien podríamos estar ante algún falso positivo o por el contrario, ciertos loci se estarían obviando en forma de falsos negativos. Se estima que la «missing heridability» o heredabilidad perdida reside en variantes genéticas de efecto modesto localizadas en loci todavía desconocidos, además

TABLA 1. *PD-linked Genes*

Locus	Position	Gene	Inheritance	Function	Implications
PARK1 & 4	4q21-23	<i>α-synuclein (SNCA)</i>	Dominant	Unclear (presynaptic protein)	Protein aggregation
PARK2	6q25.2-27	<i>Parkin</i>	Recessive	Ubiquitin ligase	Aberrant protein & mitochondrial homeostasis
PARK3	2p13	<i>Unknown</i>	Dominant	-	
PARK5	4p14	<i>UCHL1</i>	Dominant	Ubiquitin hydrolase	Aberrant protein homeostasis
PARK6	1p35-36	<i>PINK1</i>	Recessive	Putative serine/threonine kinase	Aberrant mitochondrial homeostasis
PARK7	1p36	<i>DJ-1</i>	Recessive	Redox sensor	Oxidative stress
PARK8	12p11.2-q13.1	<i>LRKK2</i>	Dominant	Putative serine/threonine kinase	Aberrant phosphorylation
PARK9	1p36	<i>ATP13A2</i>	Recessive	Lysosomal P-type ATPase	Aberrant protein homeostasis
PARK10	1p32	<i>Unknown</i>	Unknown	-	
PARK11	2q37.1	<i>GIGYF2?</i>	Dominant	-	
PARK12	Xq21-q25	<i>Unknown</i>	Unknown	-	
PARK13	2p12	<i>OMIT1/A2</i>	Dominant	Mitochondrial serine protease	Aberrant mitochondrial homeostasis?
PARK14	22q13.1	<i>PLA2G6</i>	Recessive	Phospholipase	Aberrant lipid homeostasis?
PARK15	22q12-q13	<i>FBXO7</i>	Recessive	Component of SCF E3 complex	Aberrant protein homeostasis?
PARK16	1q32	<i>Unknown</i>	Unknown	-	
PARK17	16p12.1-q12.1	<i>VPS35</i>	Dominant	+	Aberrant endosomal recycling?

de variantes raras difíciles de estudiar con la tecnología actual, como es el caso de las CNV (del inglés: *copy number variant* o variación en el número de copias). Cabe destacar que el reciente desarrollo de técnicas de secuenciación genética de última generación, como el «*panel sequencing*», han permitido ir un paso más hacia adelante, estudiando en profundidad cada uno de los loci donde se encuentra un determinado gen e identificando nuevas variantes funcionales de riesgo potencial.

En definitiva, las nuevas técnicas de secuenciación, así como los estudios genéticos de asociación a gran escala (GWAS), están logrando expandir cada vez más el espectro de las variantes genéticas de riesgo para padecer EP. A continuación abordamos una revisión bibliográfica sobre los genes relacionados con el desarrollo de la EP.

PARK1-4/SNCA

El gen *SNCA*, localizado en el cromosoma 4 (4q22.1), codifica la α -sinucleína (α -syn), una proteína de 140 aminoácidos considerada el principal sello patológico de la EP. Si se encuentra mutada o anormalmente elevada, tiende a formar oligómeros insolubles que se agregan en fibrillas dando lugar a unas inclusiones intracitoplasmáticas llamadas Cuerpos de Lewy. Recientemente se ha sugerido que esta proteína tiene propiedades priónicas, ya que es capaz de difundirse de neurona a neurona y propagar su plegamiento erróneo [18].

Las mutaciones en este gen constituyen la segunda causa más común de EP de heredabilidad autosómica dominante. La A53T fue la primera mutación identificada en una familia de origen italiano [19]. Posteriormente se identificaron otras dos mutaciones puntuales, la A30P en una familia alemana [20] y la E46K en varias familias de origen vasco [21].

Las multiplicaciones del gen, tanto duplicaciones como triplicaciones, se han relacionado con un fenotipo muy agresivo de EP familiar de inicio temprano, progresión muy rápida y severidad pronunciada [22]. Además, se ha visto que los pacientes con EP asociada a este gen suelen desarrollar un parkinsonismo atípico que cursa con demencia, pérdida progresiva de respuesta a levo-dopa y disautonomía (revisado en: [23]).

Por otro lado, el gen *SNCA* ha sido ampliamente estudiado como factor de riesgo para el desarrollo de EP esporádica en diversos GWAS llevados a cabo en población caucásica y asiática [13, 24-27]. Todos ellos han confirmado que este gen es de los principales contribuidores a la susceptibilidad genética que predispone a padecer la enfermedad. Hasta el momento, numerosos estudios caso-control han tratado de replicar estos resultados examinando la relación entre diferentes SNPs en regiones intrónicas y exónicas de este gen y la EP. Variaciones alélicas en el promotor Rep 1 del gen se han asociado con mayor riesgo para padecer EP en 11 estudios distintos [28]. También se ha visto que ciertos SNPs en la región 3' del gen actúan regulando los niveles de α -syn en el cerebro, plasma y sangre [29,30], constituyendo un factor de riesgo para desarrollar EP.

Sin embargo, la heterogeneidad de las distintas poblaciones sumada al poco poder estadístico de algunos estudios, debido a su tamaño muestral, han llevado a veces a discrepancias en los resultados obtenidos. Por tanto son necesarias replicaciones independientes en grandes cohortes de población bien definida.

PARK 2/PARKIN

Fue el segundo gen descubierto en relación a la EP. *PARK2* se localiza en el cromosoma 6 y codifica para una proteína de 465 aminoácidos llamada parkina, caracterizada como ubiquitín proteín ligasa, miembro de la familia E3 ubiquitin-ligasas. Funcionalmente, la proteína parkina es responsable de la transferencia de moléculas de ubiquitina activada a un sustrato proteico, para su posterior degradación en el sistema ubiquitin proteosoma. Además de su papel en el metabolismo de proteínas, tiene un papel igualmente importante en el control de calidad mitocondrial. Cuando por cualquier razón la mitocondria se daña y pierde su potencial de membrana, se desencadena un proceso denominado mitofagia, en colaboración con PINK1. Al desaparecer el potencial de membrana mitocondrial, PINK1 que se encuentra estabilizado y fijo a la membrana, se autofosforila. Esta proteína fosforilada es la señal para que parkina ubiquitinice las proteínas de la membrana externa mitocondrial, favoreciendo la fisión de esta parte del resto de la mito-

condria no dañada y su posterior eliminación por autofagia. Las primeras mutaciones en este gen se descubrieron en una familia japonesa [31], y son las principales causantes de EP juvenil de heredabilidad autosómica recesiva [32]. Hasta el momento, se conocen más de 100 mutaciones patogénicas, tanto asociadas a EP familiar como esporádica [33,34], que interrumpen la actividad de parkina provocando el acúmulo de proteínas tóxicas y la muerte de las neuronas dopaminérgicas. El fenotipo clínico de los pacientes se caracteriza por parkinsonismo de inicio temprano con una edad media de 30 años, aunque se han descrito casos de EP esporádica por encima de los 70 años. Suelen presentar buena respuesta a levodopa, fluctuaciones diurnas y progresión lenta. Además, uno de los rasgos anatomopatológicos más característicos es la ausencia de cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

PARK 5/UCHL1

El gen *UCHL1* codifica para una enzima llamada ubiquitín carboxil-terminal hidrolasa L1 cuya función es hidrolizar cadenas de ubiquitina generando monómeros libres de ubiquitina, que pueden ser reciclados para eliminar otras proteínas. Se ha sugerido que una menor actividad de esta proteína podría reducir la disponibilidad de los monómeros de ubiquitina provocando la acumulación de proteínas dañadas a la espera de ser degradadas. Hace más de una década se detectó su primera mutación en heterocigosis, la I93M, en una pareja de hermanos alemanes que eran portadores asintomáticos [35]. Posteriormente se identificó otra mutación, la M124L, que tampoco desarrollaba la enfermedad. Es posible que ciertos SNPs puedan contribuir a la aparición de EP esporádica. Sin embargo, su relevancia no está clara.

PARK 6/PINK1

PINK1 se localiza en el cromosoma 1 y codifica para una proteína quinasa mitocondrial llamada PTEN–induced kinase 1 o pantotenato quinasa. El descubrimiento de sus primeras mutaciones en una familia siciliana [36] puso de manifiesto por primera vez la implicación de la mitocondria en la patogénesis de la EP. *PINK1* es una proteína citosólica que requiere que la membrana mitocondrial esté polarizada para pasar al interior de la misma, donde rápidamente se degrada. Si la mitocondria pierde su potencial, *PINK1* permanece en el exterior y marca a la mitocondria para su eliminación por autofagia. Las mutaciones en *PINK1*, menos frecuentes que las encontradas en *PARK2*, son las responsables de una forma de parkinsonismo de aparición temprana, de heredabilidad autosómica recesiva con una penetrancia muy alta [37]. Hasta el momento se han descrito más de 50 mutaciones distintas [38], implicadas tanto en formas familiares como en formas esporádicas de inicio temprano (revisado en: [39]). El fenotipo de los pacientes portadores de estas muta-

ciones es muy parecido al de aquellos portadores de mutaciones en *PARK2*, caracterizado por una progresión especialmente lenta, buena respuesta a L-dopa y alta incidencia de manifestaciones psiquiátricas [40].

PARK7/DJ-1

DJ-1 codifica una proteína de 189 aminoácidos a la que se le ha atribuido una función antioxidante, actuando como sensor frente al estrés oxidativo y protegiendo a la célula [41]. Varios estudios han demostrado que la ausencia de esta proteína en las neuronas dopaminérgicas conlleva neurodegeneración mediada por estrés oxidativo [42]. El hecho de que mutaciones en *DJ-1* sean responsables de formas familiares de EP es la evidencia más directa de la implicación del estrés oxidativo en su patogénesis. La patología de los pacientes con mutaciones en *DJ-1* es aún desconocida. Varios grupos demostraron que *DJ-1* podría prevenir la agregación de la α -syn (revisado en: [39]) y mitigar el efecto dañino de las formas patogénicas mutadas. Más recientemente se ha visto que *DJ-1* actúa en consonancia con parkina y *PINK1* regulando procesos de mitofagia.

Las mutaciones en este gen son bastante raras, responsables de una forma familiar autosómica recesiva de EP. La primera mutación, la L166P, se detectó en una familia consanguínea de Italia [43]. A partir de entonces, otras mutaciones han sido descritas. En un meta-análisis se vio que son más frecuentes en casos familiares que en casos esporádicos [44].

PARK 8/LRRK2

Este gen localizado en el cromosoma 12, codifica la proteína kinasa 2, también llamada dardarina. Está constituida por 2527 aminoácidos y se expresa ampliamente en el cerebro. Se trata de una proteína de gran tamaño formada por dos dominios enzimáticos (GTPasa y kinasa) y varios dominios de interacción proteína-proteína. Entre sus funciones cabe destacar la unión a sustratos específicos para la ubiquitinización, tráfico vesicular e interacción con otras proteínas [45]. *LRRK2* fue identificado por primera vez en una numerosa familia japonesa [46]. Sus mutaciones son las más comunes y constituyen la principal causa de EP familiar de herencia autosómica dominante. Hasta el momento, 7 mutaciones en este gen han sido identificadas como causantes de EP tanto familiar como esporádica (revisado en: [47]). G2019S, localizada en el dominio kinasa, es la más frecuente y se caracteriza por presentar una penetrancia muy variable y dependiente de la edad y de la etnia, detectándose con mayor prevalencia en pacientes del norte de África y en judíos Ashkenazi.

Parece ser que algunas de las mutaciones dan lugar a un aumento de la actividad kinasa, lo que explicaría la fosforilación de la α -syn y la proteína tau, alterando sus conformaciones y funciones [48]. El fenotipo de los pacientes portado-

res de mutaciones en *LRRK2* es de una EP típica, con un inicio tardío y con buena respuesta a L-dopa [49]. Algunos estudios recientes han mostrado una fuerte asociación con la EP [26,50], mientras que otros no han replicado esta asociación, sugiriendo un efecto más modesto de las distintas variantes genéticas de este gen sobre la etiología de la enfermedad [14,16,25].

PARK 9/ATP13A2

El gen *ATP13A2* codifica para una ATPasa lisosomal cuyas mutaciones son causantes de un trastorno recesivo llamado Síndrome de Kufor-Rakeb que cursa con parkinsonismo. Recientes investigaciones han identificado mutaciones en este gen en sujetos con parkinsonismo de inicio temprano, tanto en homocigosis como en heterocigosis [51,52]. El mecanismo por el cual estas mutaciones causan parkinsonismo no se conoce completamente, pero parece ser que alteran la estabilidad de la enzima favoreciendo su eliminación. Como consecuencia, proteínas como la α -syn, quedan a la espera de ser degradadas por la vía lisosomal, se acumulan y forman agregados.

PARK 11/GIGYF2

El gen *GIGYF2* codifica para una proteína implicada en procesos de regulación de receptores tirosin-kinasa. Mutaciones en este gen fueron inicialmente relacionadas con la EP, aunque estudios posteriores no han sido capaces de replicar esta asociación [53,54]. Por tanto, no parece que juegue un papel importante en la patogénesis de la EP.

PARK 13/Omi/HtrA2

El gen *Omi/HtrA2* codifica para una proteasa cuyo mal funcionamiento conduce a alteraciones en la morfología mitocondrial provocando disfunción mitocondrial [55]. Aunque se ha sugerido que mutaciones en este gen son causantes de parkinsonismo, [56] su relevancia es cuestionada, ya que se ha visto que en muchos casos se encuentran con la misma frecuencia en pacientes y controles.

PARK 14/PLA2G6

El gen *PLA2G6* codifica para una proteína de la familia de las fosfolipasas A2 calcio-independientes, involucradas en rutas lipídicas. Recientemente, este gen ha sido relacionado con un tipo de parkinsonismo de heredabilidad autosómica recesiva que

curso con distonía [57]. El fenotipo de estos pacientes es de inicio tardío y buena respuesta a levo-dopa. Evidencias recientes demuestran que sus mutaciones originan una pérdida de su función catalítica, sugiriendo la posibilidad de una posible implicación del metabolismo lipídico en la patogénesis de la EP.

PARK 15/FBXO7

Este gen codifica para la proteína F-box protein 7 (FBXO7). Se le ha atribuido función de ubiquitín ligasa en el sistema de degradación proteosomal, además de actuar regulando a parkina en procesos mitocondriales. La pérdida de su función conlleva disrupción de la homeostasis proteica. Recientemente se la ha relacionado con una forma autosómica recesiva causante de parkinsonismo de inicio temprano [58]. Los pacientes portadores de mutaciones en este gen presentan buena respuesta a levo-dopa y alteraciones piramidales.

PARK 17/VPS35

El gen *VPS35* codifica para una proteína llamada Vacuolar Protein Sorting 35 (VPS35) que actúa mediando el transporte retrógrado entre los endosomas y el aparato de Golgi. Mutaciones en este gen alteran el sistema de tráfico vía endosoma-lisoma alterando la homeostasis neuronal. Dos recientes estudios identificaron una mutación, la D620N, como causante de una forma de EP autosómica dominante en población caucásica [59]. Posteriormente, un estudio multicéntrico determinó la frecuencia y patogenicidad de ciertas variantes génicas en distintas poblaciones, replicando los resultados anteriores e identificando una implicación de este gen en casos esporádicos [60].

PARK 18/HLA

La región HLA localizada en el cromosoma 6 contiene varios genes relacionados con el sistema inmune. El gen *HLA-DRA* codifica para la subunidad alfa de la proteína HLA-DR II. Esta proteína se ancla en la membrana de células presentadoras de antígenos (linfocitos, células dendríticas y macrófagos) y actúa presentando péptidos procedentes de proteínas extracelulares a los linfocitos T y regulando la respuesta inmune e inflamatoria. Un reciente GWAS ha demostrado que existe asociación genética con la EP esporádica de inicio tardío [61]. Este nuevo hallazgo sugeriría la importancia de la neuroinflamación y la inmunidad humoral en las rutas biológicas responsables de la patogénesis de la EP. Sin embargo, estudios posteriores a menor escala no siempre han descrito resultados concordantes [60,62-64]. Por otro lado, algunos trabajos mostraron sobreexpresión génica de *HLA-DR* en LCR y SNpc

de pacientes con EP [65,66] así como en modelos animales afectados por el neurotóxico MPTP [67].

Además, la observación de que los pacientes tratados con AINES tengan un riesgo 45% menor de sufrir la enfermedad, refuerza la hipótesis de que en la EP coexistan fenómenos de inmunidad e inflamatorios. En cualquier caso, son necesarios estudios adicionales en distintas etnias para esclarecer el papel de esta región en la EP.

GBA

El gen *GBA*, localizado en el cromosoma 1, codifica para la enzima ácido- β -glucosidasa, comúnmente llamada glucocerebrosidasa, cuyas mutaciones, de heredabilidad autosómica recesiva conducen a una pérdida de su función resultando en una rara enfermedad lisosomal llamada enfermedad de Gaucher (EG). Las primeras observaciones de que algunos pacientes con EG sufrían de síntomas parkinsonianos y que aproximadamente un 25% de ellos tenían algún familiar de primer o segundo grado con EP, llevó a los investigadores a estudiar esta proteína en profundidad como posible factor de riesgo. Se vio que los familiares afectados por la EP eran portadores de mutaciones en *GBA*. Algunas mutaciones como la L444P, N370S, E326K y T369M son un factor de riesgo frecuente para el desarrollo de EP con una penetrancia mucho más baja que las clásicas mutaciones mendelianas. Un estudio reciente sugiere un riesgo de más del 30 % para portadores de mutaciones en heterocigosis, considerándose uno de los más altos descritos hasta ahora en la EP (revisado en [68]). Actualmente se han descrito más de 300 mutaciones con penetrancia variable, y se ha visto que son especialmente frecuentes en judíos de ascendencia Ashkenazi.

Entre las distintas hipótesis se ha sugerido que algunas mutaciones en *GBA* darían lugar a un plegamiento erróneo de la glucocerebrosidasa, la cual induciría disfunción lisosomal y dañaría las rutas autofágicas de degradación proteica favoreciendo la agregación de proteínas como la α -syn [69]. El fenotipo de los pacientes es muy variado, y resulta complicado establecer una relación genotipo-fenotipo. Generalmente los pacientes con mutaciones en este gen suelen padecer EP típica con inicio temprano y disfunción cognitiva asociada [70]. Estudiar este gen en profundidad supone un gran reto para los investigadores, ya que *GBA* tiene un pseudogen con el que comparte alrededor de un 96 % de homología, por lo que la identificación de mutaciones a través de secuenciación resulta particularmente complicada y debe hacerse con cautela.

MAPT

El gen *MAPT* se localiza en el cromosoma 17 y codifica para la proteína tau asociada a microtúbulos. Existen 6 isoformas de tau que se expresan abundantemente en neuronas y juegan un papel fundamental en la organización y el manteni-

miento de la estructura celular. MAPT fue inicialmente asociado a la patogénesis de las llamadas taupatías [71]. Puesto que la EP comparte algunas características clínicas con las taupatías, una serie de estudios se encaminaron a determinar la relación entre las variantes de MAPT y el riesgo para padecer EP, encontrando una correlación positiva [72]. Este gen se encuentra en una región de gran desequilibrio de ligamiento, es decir, una región que no se segrega de forma independiente y aleatoria puesto que su frecuencia de recombinación es baja. Se ha visto que engloba dos haplotipos, llamados H1 y H2. Se entiende por haplotipo el conjunto de loci que se transmiten juntos. Varios estudios han proporcionado una fuerte evidencia de que el haplotipo H1 del gen MAPT está asociado con un elevado riesgo de padecer EP [73,74]. Posteriores GWAS y estudios de asociación genética a menor escala han confirmado esta asociación [14,50,75]. Parece ser que una fosforilación excesiva de tau provoca su agregación intracelular en forma de filamentos que se agrupan en ovillos neurofibrilares y producen la neurodegeneración. Sin embargo el mecanismo por el cual las variaciones comunes en MAPT influyen en la EP, una enfermedad en la que los agregados de tau son raramente encontrados, está aún por determinar. Se ha sugerido que los agregados de tau tienden a interactuar con la α -syn asociándose con un mayor riesgo para desarrollar EP.

GAK

El gen GAK localizado en el cromosoma 4 codifica para la proteína quinasa asociada a ciclina G (GAK) o comúnmente llamada auxilina-2. Interacciona con la ciclina G controlando el ciclo celular, juega un importante papel en el tráfico vesicular [76], y en la regulación de la respuesta inflamatoria. Varias variantes de riesgo en este gen se asociaron por primera vez con la EP en un GWAS llevado a cabo en población caucásica [13]. Dos GWAS posteriores [11,61], así como estudios caso-control en población americana [77], europea [78] y asiática [79,80] han replicado estos hallazgos. Además se ha sugerido que esta proteína podría interactuar con la α -syn en una ruta implicada en la patogénesis de la EP [81]. Por otro lado, se ha visto que su expresión génica es distinta en la SNpc de pacientes con respecto a controles [82]. Si bien otros trabajos se encuentran en discordancia [83,84].

Además de todos los genes abordados en esta revisión, existen muchos otros que han sido asociados a la EP por distintos GWAS. Entre ellos cabe destacar: ACMSD, STK39, NMD3, STBD1, GPNMB, FGF20, MMP16, STX1B, ITGA8, TIT2/SYT4, MCCC1/LAMP3, SYT11/RAB25, CCDC62/H1P1 y BST1. El último meta-análisis publicado en septiembre de 2014 [85] ha identificado 6 nuevos loci implicados en la EP, entre los que cabe remarcar: SIPA1L2, INPP5F, MIR4697, GCH1, VPS13C, y DDRGK1. Se requieren estudios adicionales para poder entender la implicación de cada uno de estos genes en la patogénesis de la EP.

Conclusiones y perspectivas futuras

Siendo la EP la segunda enfermedad neurodegenerativa que más afecta a la población mundial, resulta absolutamente necesario que la investigación médica-clínica invierta recursos dirigidos a dilucidar sus causas complejas y multifactoriales. La genética y su tecnología de última generación, nos están aportando nueva luz en el esclarecimiento de la etiología de la EP, y la aplicación clínica de los GWAS no parece estar muy lejos. Las variantes genéticas de riesgo podrían ser una potente herramienta en el diagnóstico clínico y diferencial, permitiéndonos por un lado identificar a la población con predisposición genética a desarrollar EP, y por otro lado caracterizar los distintos fenotipos para entender qué implicaciones clínicas encierra cada variante génica. Es posible que existan una serie de variantes génicas no lo suficientemente comunes como para ser detectadas por GWAS, con poca penetrancia como para ser identificadas en estudios de ligamiento en familias, o simplemente difíciles de determinar con la tecnología de secuenciación actual.

No obstante, cabe destacar que conforme la generación de datos genéticos está aumentando, nuestra capacidad de interpretación del efecto funcional de estas nuevas variantes en la patogénesis de la EP está quedando atrás. Los análisis funcionales forman parte del complemento que todo estudio genético requiere. Identificar el efecto de cada una de las variantes genéticas en las rutas biológicas involucradas en la EP resulta crucial. Por tanto, como resultado de la bibliografía revisada, se sugiere la realización de estudios funcionales que nos ayuden a comprender mejor la enfermedad, conseguir identificar nuevas dianas terapéuticas y desarrollar tratamientos farmacológicos más eficaces.

Bibliografía

1. Gowers W. A manual of diseases of the nervous system, London 2 vols. J. & A. Churchill. 1886-1888. Langston JW, Ballard P, Tetud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219(4587):979-80.
2. Ward CD, Duvoisin RC, Ince SE, Nutt JD, Eldridge R, Calne DB. Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of quadruplets. *Neurology*. 1983; 33(7):815-24.
3. Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R, Langston JW. Parkinson disease in twins: An etiologic study. *JAMA*. 1999; 281(4):341-6.
4. Payami H, Larsen K, Bernard S, Nutt J. Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. *Ann Neurol* 1994; 36(4):659-61
5. Thacker EL, Ascherio A. Familial aggregation of Parkinson's disease: A meta-analysis. *Mov Disord*. 2008; 23(8):1174-83.
6. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822):860-921.
7. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001; 291(5507):1304-51.

8. International HapMap 3 Consortium¹, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human population. *Nature*. 2010; 467(7311):52-8.
9. Maraganore DM, de Andrade M, Lesnick TG, Strain KJ, Farrer MJ, Rocca WA et al. High resolution whole-genome association study of Parkinson's disease *Am J Hum Genet*. 2005; 77(5):685-93.
10. Fung HC, Scholz S, Matarin M, Simón-Sánchez J, Hernandez D, Britton A et al. Genome wide genotyping in Parkinson's disease and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. *Lancet Neurol*. 2006; 5(11):911-6.
11. Lin MK, Farrer M. Genetics and genomics of Parkinson's disease. *Genome Med* 2014; 6(6):48.
12. Pankratz N, Wilk JB, Latourelle JC, DeStefano AL, Halter C, Pugh EW. Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Hum Genet*. 2009; 124(6):593-605.
13. Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet*. 2009; 41(12):1308-12.
14. Saad M, Lesage S, Saint-Pierre A, Corvol JC, Zelenika D, Lambert JC. Genome-wide association study confirms BST1 and suggests a locus on 12q24 as the risk loci for Parkinson's disease in the European population. *Hum Mol Genet*. 2011; 20(3):615-27.
15. UK Parkinson's Disease Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Spencer CC, Plagnol V, Strange A, Gardner M. Dissection of the genetics of Parkinson's disease identifies an additional association 5' of SNCA and multiple associated haplotypes at 17q21. *Hum Mol Genet*. 2011; 20(2):345-53.
16. Simón-Sánchez J, van Hilten JJ, van de Warrenburg B, Post B, Berendse HW, Arepalli S. Genome-wide association study confirms extant PD risk loci among the Dutch. *Eur J Hum Genet*. 2011; 19(6):655-61.
17. Olanow CW, Brundin P. Parkinson's disease and alpha-synuclein : is Parkinson's disease a prion-like disorder? *Mov Disord*. 2013; 28(1):31-40.
18. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997; 276(5321):2045-7.
19. Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*. 1998; 18(2):106-8.
20. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinsonism and Lewy body dementia. *Ann Neurol*. 2004; 55(2):164-73.
21. Ross OA, Braithwaite AT, Skipper LM, Kachergus J, Hulihan MM, Middleton FA, et al. Genomic investigations of alpha-synuclein multiplications and parkinsonism. *Ann Neurol*. 2008; 63(6):743-50.
22. Spatola M, Wider C. Genetics of Parkinson's disease: the yield, Parkinsonism and related disorders. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014; 20 Suppl 1:S35-8.

23. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009; 41(12):1303-7.
24. Edwards TL, Scott WK, Almonte C, Burt A, Powell EH, Beecham GW et al. Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann Hum Genet.* 2010; 74(2):97-109.
25. International Parkinson Disease Genomics Consortium, Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin UM, Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet.* 2011; 377(9766):641-9.
26. Liu X, Cheng R, Verbitsky M, Kisselev S, Browne A, Mejia-Sanatana H et al. Genome-wide association study identifies candidate genes for Parkinson's disease in an Ashkenazi Jewish population. *BMC Med Genet.* 2011; 12:104
27. Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger R et al. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson's disease. *JAMA.* 2006; 296(6):661-70.
28. Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, Munz M, Schweitzer KJ, Wolf B et al. Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB J.* 2008; 22(5):1327-34.
29. Mata IF, Shi M, Agarwal P, Chung KA, Edwards KL, Factor SA et al. SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Arch Neurol.* 2010; 67(11):1350-6.
30. Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(3):588-96.
31. Xiomerisiou G, Dardiotis E, Tsimourtou V, Kounta PM, Paterakis KN, Kapsalaki EZ et al. Genetic basis of Parkinson disease. *Neurosurg Focus.* 2010; 28(1):E7.
32. Wang H, Song P, Du L, Tian W, Yue W, Liu M et al. Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *J Biol Chem.* 2011; 286(13):11649-58.
33. Foroud T, Uniacke SK, Liu L, Pankratz N, Rudolph A, Halter C et al. Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease. *Neurology.* 2003; 60(5):796-801.
34. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* 1998; 395(6701):451-2.
35. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 2004; 304(5674):1158-60.
36. Schulte C, Gasser T. Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *Appl Clin Genet.* 2011; 4:67-80.
37. Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat.* 2010; 31(7):763-80.
38. Chai C, Lim KL. Genetic insights into sporadic Parkinson's disease pathogenesis. *Curr Genomics.* 2013; 14(8):486-501.

39. Li Y, Tomiyama H, Sato K, Hatano Y, Yoshino H, Atsumi M et al. Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Neurology*. 2005; 64(11):1955-7.
40. Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(24):9103-8.
41. Menzies FM, Yenissetti SC, Min KT. Roles of Drosophila DJ-1 in survival of dopaminergic neurons and oxidative stress. *Curr Biol*. 2005; 15(17):1578-82.
42. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003; 299(5604):256-9.
43. Kilarski LL, Pearson JP, Newsway V, Majounie E, Knipe MD, Misbahuddin A et al. Systematic review and UK-based study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012; 27(12):1522-9.
44. Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010; 23(4):228-42.
45. Funayama M, Hasegawa K, Ohta E, Kawashima N, Komiyama M, Kowa H. An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann Neurol*. 2005; 57(6):918-21.
46. Bonifati V. Genetics of Parkinson's disease--state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014; 20 Suppl 1:S23-8.
47. Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, Braun RJ, O'Neill E, Meitinger T. The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet*. 2006; 15(2):223-32.
48. Lesage S, Brice A. Role of mendelian genes in «sporadic» Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012; 18 Suppl 1:S66-70.
49. Lill CM, Roehr JT, McQueen MB, Kavvoura FK, Bagade S, Schjeide BM et al. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet*. 2012; 8(3):e1002548.
50. Di Fonzo A, Chien HF, Socal M, Giraudo S, Tassorelli C, Iliceto G et al. ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology*. 2007; 68(19):1557-62.
51. Brüggemann N, Hagenah J, Reetz K, Schmidt A, Kasten M, Buchmann I et al. Recessively inherited parkinsonism: effect of ATP13A2 mutations on the clinical and neuroimaging phenotype. *Arch Neurol*. 2010; 67(11):1357-63.
52. Tan EK, Schapira AH. Summary of GIGYF2 studies in Parkinson's disease: the burden of proof. *Eur J Neurol*. 2010; 17(2):175-6.
53. Guella I, Pistocchi A, Asselta R, Rimoldi V, Ghilardi A, Sironi F et al. Mutational screening and zebrafish functional analysis of GIGYF2 as a Parkinson-disease gene. *Neurobiol Aging*. 2011; 32(11):1994-2005.
54. Kieper N, Holmström KM, Ciceri D, Fiesel FC, Wolburg H, Ziviani E et al. Modulation of mitochondrial function and morphology by interaction of Omi/HtrA2 with the mitochondrial fusion factor OPA1. *Exp Cell Res*. 2010; 316(7):1213-24

55. Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D et al. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(15):2099-111.
56. Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW et al. Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol.* 2009; 65(1):19-23.
57. Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L et al. FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology.* 2009; 72(3):240-5.
58. Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, Graf E, Eck SH, Offman MN et al. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2011; 89(1):168-75
59. Sharma M, Ioannidis JP, Aasly JO, Annesi G, Brice A, Bertram L et al. A multi-centre clinico-genetic analysis of the VPS35 gene in Parkinson disease indicates reduced penetrance for disease-associated variants. *J Med Genet.* 2012; 49(11):721-6.
60. Hamza TH, Zabetian CP, Tenesa A, Laederach A, Montimurro J, Yearout D et al. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2010; 42(9):781-5.
61. Guo Y, Deng X, Zheng W, Xu H, Song Z, Liang H et al. HLA rs3129882 variant in Chinese Han patients with late-onset sporadic Parkinson disease. *Neurosci Lett.* 2011; 501(3):185-7.
62. Chiang HL, Lee-Chen GJ, Chen CM, Chen YC, Lee CM, Liao MH et al. Genetic analysis of HLA-DRA region variation in Taiwanese Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012; 18(4):391-3.
63. Lin CH, Chen ML, Tai YC, Yu CY, Wu RM. Reaffirmation of GAK, but not HLA-DRA, as a Parkinson's disease susceptibility gene in a Taiwanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2013; 162B(8):841-6.
64. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 1988; 38(8):1285-91.
65. Fiszer U, Mix E, Fredrikson S, Kostulas V, Link H. Parkinson's disease and immunological abnormalities: increase of HLA-DR expression on monocytes in cerebrospinal fluid and of CD45RO+T cells in peripheral blood. *Acta Neurol Scand.* 1994; 90(3):160-6.
66. McGeer PL, Schwab C, Parent A, Doudet D. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol.* 2003; 54(5):599-604.
67. Rana HQ, Balwani M, Bier L, Alcalay RN. Age-specific Parkinson disease risk in GBA mutation carriers: information for genetic counseling. *Genet Med.* 2013; 15(2):146-9.
68. Sidransky E, Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2012; 11(11):986-98.
69. Nichols W, Pankratz N, Marek DK, Pauciulo MW, Elsaesser VE, Halter CA et al. Mutations in GBA are associated with familial PD susceptibility and age at onset. *Neurology.* 2009; 72(4):310-6.
70. Baker MG. Depression, psychosis and dementia in Parkinson's disease. *Neurology.* 1999; 52(7 Suppl 3):S1.

71. Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Lyons K et al. Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes. *JAMA*. 2001; 286(18):2239-44.
72. Wider C, Vilarinho-Güell C, Jasinska-Myga B, Heckman MG, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA et al. Association of the MAPT locus with Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2010; 17(3):483-6.
73. Zabetian CP, Hutter CM, Factor SA, Nutt JG, Higgins DS, Griffith A et al. Association analysis of MAPT H1 haplotype and subhaplotypes in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2007; 62(2):137-44
74. Pankratz N, Beecham GW, DeStefano AL, Dawson TM, Doheny KF, Factor SA et al. Meta-analysis of Parkinson's disease: identification of a novel locus, RIT2. *Ann Neurol*. 2012; 71(3):370-84.
75. Sato J, Shimizu H, Kasama T, Yabuta N, Nojima H. GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane trafficking, localizes not only in the cytoplasm but also in the nucleus.
76. Rhodes SL, Sinsheimer JS, Bordelon Y, Bronstein JM, Ritz B. Replication of GWAS associations for GAK and MAPT in Parkinson's disease. *Ann Hum Genet*. 2011; 75(2):195-200.
77. Saad M, Lesage S, Saint-Pierre A, Corvol JC, Zelenika D, Lambert JC et al. Genome-wide association study confirms BST1 and suggests a locus on 12q24 as the risk loci for Parkinson's disease in the European population. *Hum Mol Genet*. 2011; 20(3):615-27.
78. Li NN, Chang XL, Mao XY, Zhang JH, Zhao DM, Tan EK et al. GWAS-linked GAK locus in Parkinson's disease in Han Chinese and meta-analysis. *Hum Genet*. 2012; 131(7):1089-93.
79. Zhou LL, Zhang X, Bao QQ, Liu RP, Gong MY, Mao GY et al. Association analysis of PARK16-18 variants and Parkinson's disease in a Chinese population. *J Clin Neurosci*. 2014; 21(6):1029-32.
80. Dumitriu A, Pacheco CD, Wilk JB, Strathearn KE, Latourelle JC, Goldwurm S et al. Cyclin-G-associated kinase modifies α -synuclein expression levels and toxicity in Parkinson's disease: results from the GenePD Study. *Hum Mol Genet*. 2011; 20(8):1478-87
81. Grünblatt E, Mandel S, Jacob-Hirsch J, Zeligson S, Amariglio N, Rechavi G et al. Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *J Neural Transm*. 2004; 111(12):1543-73.
82. Moran LB, Duke DC, Deprez M, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB et al. Whole genome expression profiling of the medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurogenetics*. 2006; 7(1):1-11.
83. Hauser MA, Li YJ, Xu H, Noureddine MA, Shao YS, Gullans SR. Expression profiling of substantia nigra in Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, and frontotemporal dementia with parkinsonism. *Arch Neurol*. 2005; 62(6):917-21.
84. Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, Saad M. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet*. 2014; 46(9):989-93.

MGMT y CD133 como biomarcadores pronósticos en pacientes con glioblastoma tratados con temozolamida y radioterapia

Oliver JA, Melguizo C, Ortiz R, Álvarez P, Rodríguez F, Prados J.

Resumen

El glioblastoma multiforme (GBM), el tumor primario más frecuente que afecta a las células gliales del sistema nervioso central, se caracteriza por su pobre pronóstico con una tasa de supervivencia de 9 a 12 meses. La respuesta a la temozolamida (TMZ), agente alquilante de elección para este tipo tumoral, no es uniforme, no existiendo en la actualidad biomarcadores con valor pronóstico. CD133 es una glicoproteína transmembrana relacionada con las «cancer stem cells», población celular que se caracteriza por ser quimio/radio-resistente. Por otra parte, O6-metilguanina DNA metiltransferasa (MGMT), una enzima reparadora de ADN, es capaz de eliminar los grupos alquilo introducidos por la TMZ evitando su actividad terapéutica.

Nuestro objetivo ha sido analizar ambas moléculas, CD133 y MGMT, como dos posibles marcadores pronósticos de glioblastoma. Nuestro estudio incluye el análisis de 78 pacientes diagnosticados de GBM y tratados con radioterapia y TMZ. Se determinó el estado de metilación de MGMT y el nivel de expresión proteico de MGMT y CD133, realizando una correlación con la supervivencia global y supervivencia libre de progresión de los pacientes.

Nuestros resultados demostraron que el estado de metilación del promotor de MGMT posee un valor predictivo, mientras que la expresión de MGMT ó CD133 no se correlaciona con la supervivencia de los pacientes. No se observó ninguna asociación entre ambos biomarcadores. Nuestros resultados sugieren que el estado de metilación del promotor de MGMT en GBM puede ser relevante como biomarcador de respuesta al tratamiento en estos pacientes.

Introducción

EPIDEMIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) son aproximadamente del 2 al 3% de todos de los cánceres. Estos tumores tienen una incidencia de 14,8 por cada

100.000 personas/año y aproximadamente la mitad son histológicamente benignos. Las mujeres tienen una incidencia ligeramente superior (15,1/100.000 personas/año) que hombres (14,3/100.000 personas/años). Los tumores malignos del SNC son la principal causa de muerte por tumores sólidos en niños y la tercera causa de muerte por cáncer en adolescentes y adultos [1]. Como media estos pacientes tienen una supervivencia de 9 a 12 meses [2]. La organización mundial de la salud (OMS) clasifica los tumores del SNC en varios grados siendo el glioblastoma multiforme (GBM) el grado más maligno dentro de los tumores astrocíticos (astrocitoma de grado IV) [3].

ALTERACIONES GENÉTICAS

En esta patología, las células gliales localizadas en el cerebro van adquiriendo mutaciones/delecciones en los cromosomas 10q, 10p, 9p, 17p and 13q [4] y en los genes que codifican para las proteínas: *epidermal growth factor/receptor* (EGF/R), *mouse double minute 2, 3* (MDM2), *platelet-derived growth factor/receptor* (PDGF/R), *deleted in colorectal cancer tumor suppressor gene* (DCC), las proteínas gen tumor supresoras: p16 y TP53, *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) [5] y Rb [6] entre otras. Además estos cambios van acompañados de alteraciones epigénéticas en el ADN de genes específicos como proteínas tumor supresoras (INK4A, INK4B, APC), enzimas (GSTP1, MGMT, DAPK1), receptores (RARβ), proteínas asociadas a la muerte celular programada (DAPK1), adhesión celular (CDH1) y reguladoras de cinasas (CCND2), aumentando de este modo la complejidad de la patología y las posibles dianas para nuevos tratamientos [7].

SINTOMATOLOGÍA

Los pacientes con esta patología llegan a los centros hospitalarios con una sintomatología que abarca desde déficits focales, crisis epilépticas o síntomas de hipertensión intracraneal [8] hasta cefaleas de carácter matutino, crisis comiciales, alteración del nivel de conciencia, náuseas y vómitos [2].

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico inicial se basa en el estudio por imagen mediante resonancia magnética nuclear (RMN) con contraste (gadolinio) y tomografía axial computarizada (TAC), siendo necesario para el diagnóstico definitivo el estudio histológico, ya que existen gran variedad de lesiones con características radiológicas similares [9, 10].

TRATAMIENTO

A pesar de no existir un tratamiento óptimo para GBM, siempre que sea posible, se aplica la exéresis quirúrgica radical junto con radio-quimio/terapia postoperatoria, siendo éstos elementos básicos en el tratamiento [11-13].

El *tratamiento quirúrgico* va a depender de la localización del tumor, la edad del paciente y el grado de Karnofski. Cuando existen varios focos tumorales, el área infiltrada es mayor, pudiendo existir grupos de células neoplásicas que los unan. En estos casos la resección tumoral es más compleja. Con la resección se consigue tejido para el diagnóstico histológico, se reduce la presión intracraneal y se consigue la citorreducción del tumor, lo cual facilita su posterior tratamiento [1, 13, 14].

En relación a la *radioterapia* se aplica sobre las lesiones con un margen de seguridad [11]. El principal problema que presenta es que induce deterioro cognitivo. A pesar de esto, gracias a los avances en este campo como la radioterapia tridimensional y el uso de colimitadores multicapas que permiten variar la intensidad de radiación en diferentes localizaciones han permitido la reducción de este problema [1].

En último lugar, una vez realizado el diagnóstico histológico se puede además aplicar un régimen de *quimioterapia* siendo la temozolamida (TMZ) el más ampliamente utilizado. La TMZ es un fármaco alquilante oral de segunda generación con alta biodisponibilidad, rápida absorción y un favorable perfil de toxicidad no acumulable. Su principal función como agente alquilante es la introducción de alquilaciones en el DNA que generan su fragmentación, parada de la proliferación celular y dependiendo del estado de p53 apoptosis [15]. En los pacientes con GBM, la radioterapia asociada a la temozolamida como tratamiento concomitante y adyuvante, mejora la supervivencia de forma significativa en relación a la radioterapia aislada [16].

O6-METILGUANINA-ADN-METILTRANSFERASA O MGMT

La proteína MGMT es una enzima reparadora que tiene como función la eliminación de los grupos alquilo en la posición O6-metilguanina del ADN introducidos por agentes alquilantes exógenos entre ellos TMZ. Su gen se ha observado metilado/silenciado en pacientes con GBM [17] pudiendo favorecer una mejor respuesta al tratamiento con agentes alquilantes [17, 18]. Por otra parte, se ha observado que los agentes alquilantes exógenos como la TMZ, son moléculas altamente reactivas que causan la muerte celular por alquilación del ADN en la posición O6 de la guanina. Este proceso provoca la rotura de la cadena doble del ADN [15]. De este modo, MGMT y TMZ, tienen efecto opuesto, la TMZ genera el entrecru-

zamiento y rotura de ADN de doble cadena y la enzima MGMT, debido a su actividad, invierte la alquilación en la posición O6 de la guanina, eludiendo así la formación de los entrecruzamientos letales (Figura 1).

Por otra parte, se ha demostrado en la línea celular humana de glioblastoma U373MG que la combinación de TMZ con radioterapia es el tratamiento más efectivo [19]. A nivel celular, se ha apreciado que además la TMZ arresta las células entre G2 y M, estado en el cual es más sensible a la radioterapia [20]. El ensayo de la EORTC (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*), que compara la supervivencia de los pacientes con gliomas tratados con TMZ adyuvante simultánea con radioterapia, seguida de TMZ a dosis de 200 mgr/día durante 6 ciclos, frente a radioterapia sola, ha mostrado eficacia y aumento en la tasa de supervivencia [21].

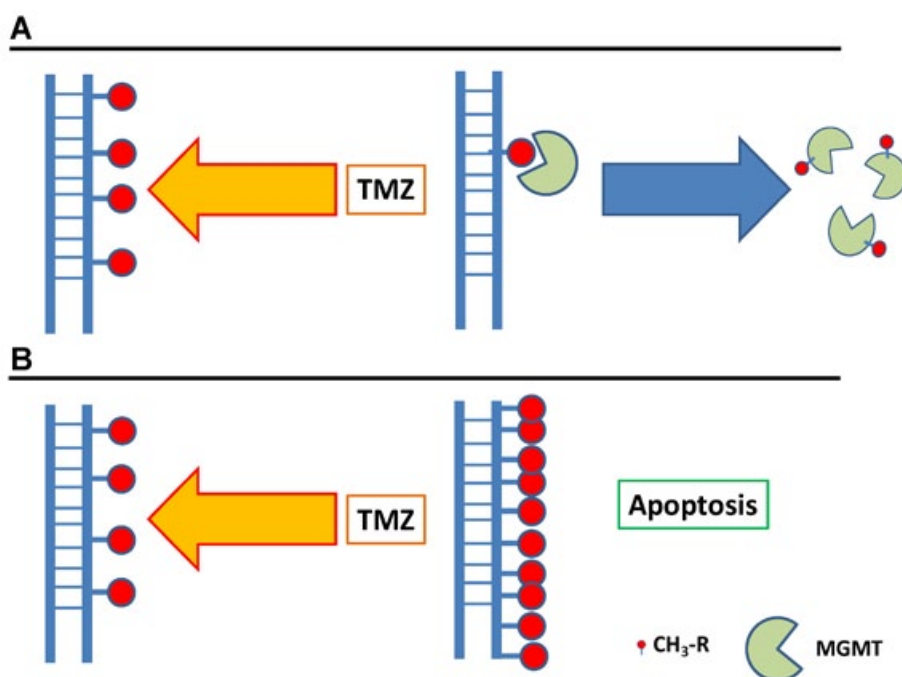


FIGURA 1. MGMT como mecanismo de resistencia frente agentes alquilantes. **A.** Cuando se expresa MGMT en la muestra tumoral ésta elimina los grupos metilo introducidos por la TMZ. **B.** Sin embargo, cuando MGMT no se encuentra en el tumor se acumulan los grupos metilo induciendo la apoptosis.

GLICOPROTEÍNA PROMININA 1 O CD133

CD133 (prominina 1) es un polipéptido de una sola cadena de 865 aminoácidos, con un peso molecular de 92 a 97 kD dependiendo de la isoforma [22,23]. El gen CD133 codifica para una glicoproteína con 5 dominios transmembrana que presenta un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal citoplasmático y dos grandes bucles extracelulares con ocho sitios de N-glicosilación [22,23] (**Figura 2**). Inicialmente, esta proteína de membrana se asoció a las células madre hematopoyéticas humanas [22,24], y más adelante a células madre neuronales [25-27]. En los últimos años se ha asociado este biomarcador a las *cancer stem cells* en tumores del sistema nervioso central [28], pulmón [29], hígado [30], páncreas [31] y colon [33] entre otros. Su relevancia ha llevado a la síntesis de anticuerpos contra diferentes regiones, incluyendo la región E3 del dominio extracelular (CD133/1 de Miltenyi) y el dominio C3 en la región citoplasmática (ab19898 de Abcam).

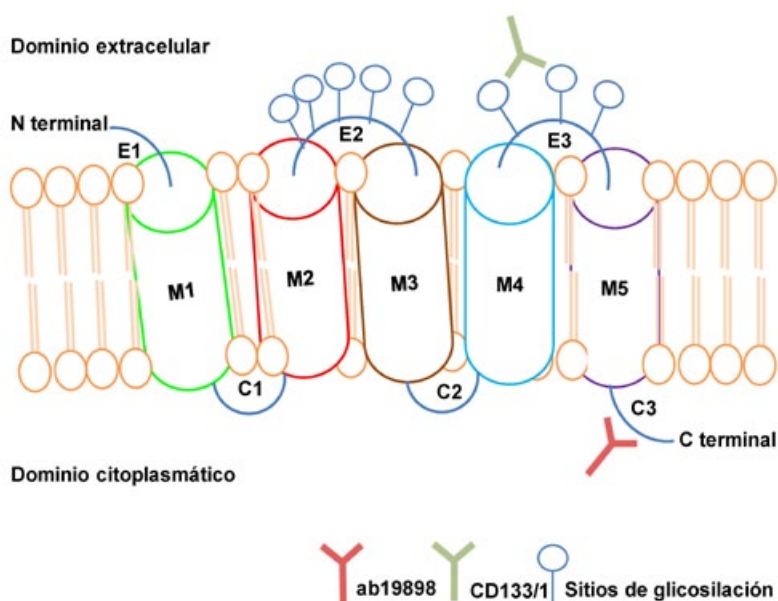


FIGURA 2. Estructura molecular de CD133. La proteína CD133 dispone de 5 pasos transmembrana y varios sitios de glicosilación. Los anticuerpos pueden reconocer estos sitios de glicosilación, como el anticuerpo CD133/1, o pueden reconocer la región C-terminal en el dominio citoplasmático como el anticuerpo ab19898.

La teoría de las *Cancer Stem Cells* postula que el tumor, en toda su complejidad, emerge a partir de una pequeña porción celular que comparte características con las células madre, entre las que están la capacidad de generar todos los tipos celulares que forman el tumor, capacidad de autorrenovarse de forma indefinida y presentar marcadores específicos propios como CD133 [33]. Algunos autores han llegado a considerar la carcinogénesis como una organogénesis aberrante [34]. En este modelo, una parte de las células que forman el tumor tienen capacidad tumorigénica, presentan marcadores de membrana específicos y pueden desarrollar los diferentes tipos celulares que se encuentran en un tumor (Figura 3) [35].

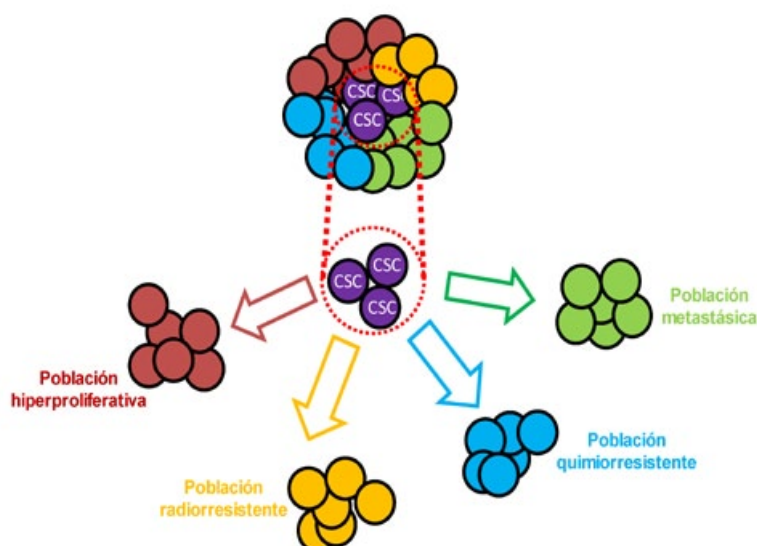


FIGURA 3. *Modelo jerárquico*. Según este modelo, únicamente las CSC son capaces de diferenciarse y dar lugar a los distintos tipos celulares que conforman el tumor y mantener al mismo tiempo la capacidad de autorrenovarse.

En las CSCs se ha observado que coexisten la división asimétrica, en la cual a partir de una CSC se obtiene una célula CSC y otra célula tumoral no CSC (fenómeno propio de las células madre de tejido normal) y la división simétrica por la cual se obtienen dos CSCs a partir de una célula CSC. De este modo, en los tumores se observa un mayor número de células CSCs que el que cabría esperar de células madre no tumorales en tejido normal [36]. Por otra parte, se piensa que las CSCs tienen un ciclo celular mucho más ralentizado (parecido al de las células madre), presumiblemente debido a que se encuentran en una fase tipo G0. Todo

indica que las CSCs son una población celular quiescente [37]. Por último, las CSCs muestran alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN como MGMT. Estudios previos *in vitro*, han mostrado que uno de los mecanismos responsables de la quimiorresistencia frente a TMZ en las CSC en GBM es la O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) [38]. Además, se ha observado la sobreexpresión de un conjunto de transportadores tipo ATP-binding *cassette* (ABC) que actúan frente a los fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer, lo que favorece su quimiorresistencia [39] y se ha asociado a la radiorresistencia, observándose marcadores sobreexpresados del tipo de ALDH1, BMI1 y TGF- β [40]. Además, las CSCs se han correlacionado con la presencia de células tumorales circulantes que promueven la metástasis [41,42]. Este conjunto de propiedades sugieren que las CSCs son una población que favorece la recidiva de la enfermedad y metástasis.

Objetivos

El principal objetivo de nuestro estudio es determinar el valor pronóstico de MGMT analizando tanto el estado de metilación y la expresión proteica en pacientes diagnosticados de GBM tratados mediante radioterapia y TMZ. Además, evaluamos la expresión inmunohistoquímica de CD133 analizando si existe asociación con MGMT y las variables clínicas como la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.

Material y métodos

MUESTRAS

Las muestras se obtuvieron del Servicio anatomopatológico del Hospital Virgen de las Nieves de Granada y el Hospital de la Universidad de Sassari (Italia), desde 2001 a 2009. Los comités de ética de ambos hospitales aprobaron la recopilación y el uso de las muestras de tejido de tumor cerebral humano. De este modo, contamos con muestras de tejido tumoral de 78 pacientes diagnosticados y confirmado histológicamente, con una puntuación funcional de Karnofsky (KPS) mayor o igual a 60. Los pacientes fueron seleccionados independientemente de la extensión de la cirugía. Todos los pacientes fueron tratados con el mismo régimen que consistía en quimiorradioterapia concurrente (2 Gy por fracción, una vez al día, cinco días a la semana, 60 Gy dosis total) con TMZ concomitante (75 mg/m² de superficie corporal por día durante la radioterapia) seguido por TMZ adyuvante (200 mg/m² de área de superficie corporal). La supervivencia global (SG) se calculó a partir de la fecha del diagnóstico y la supervivencia libre de progresión (SLP) se evaluó de acuerdo a los criterios de MacDonald [43]. Las características de los pacientes se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1. *Características de los paciente (n = 78).*

Edad (años)	Rango Media	24–81 56
Sexo	Hombre Mujer	42 (53.8%) 36 (46.1%)
Localización del tumor	Frontal Parietal Temporal Occipital Más de un lóbulo	20 (25.6%) 13 (16.6%) 13 (16.6%) 11 (14.1%) 21 (26.9%)
Duración de los síntomas antes del diagnóstico	< 3 meses ≥ 3 meses	60 (76.9%) 18 (23.1%)
Puntuación de la escala de Karnofsky	≥ 60	78 (100%)

EXTRACCIÓN DE ADN, TRATAMIENTO CON BISULFITO Y PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MSP)

Se extrajo el ADN siguiendo y de acuerdo con los protocolos estándar ya establecidos. Los patrones de metilación de las islas CpG del promotor de MGMT fueron determinados mediante el pretratamiento con bisulfito mediante el kit Epitect (Qia-gen), el cual modifica las secuencias no metiladas, pero no las metiladas, transformando las citosinas en uracilos. La PCR específica de metilación (MSP) se llevo a cabo con los *primers* específicos para las secuencias metiladas o no metiladas de ADN [44]. Los *primers* para la secuencia no metilada eran 5'-TTTGTGTTTTGATG-TTTGTAGGTTTTGT-3' (*forward*), y 5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3' (*reverse*), y para la secuencia metilada: 5' TTTGACGTCTAGGTTTTCGC-3' (*forward*) y 5'-GCACTCTTCCGAAAAC GAAACG-3' (*reverse*). Los productos amplificados de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 3%, se visualizaron por tinción con bromuro de etidio y se examinaron bajo luz ultravioleta.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la tinción inmunohistoquímica se utilizaron los anticuerpos de: Santa Cruz Biotechnology para MGMT (1:50) y Abcam para CD133 (1:50). La inmunotinción se llevó a cabo mediante el *Bond Polymer Refine Detection system* de Leica. De

este modo, los bloques de parafina más representativos fueron cortados en series consecutivas. Para la inmunotinción se utilizó el *Microprobe Immuno/DNA stainer* de Fisher Scientific. Las secciones se desparafinaron en xileno y se trataron con 0,3% de peróxido de hidrógeno para bloquear la peroxidasa endógena. Las secciones se lavaron con solución fosfato-salina y después se incubaron con los anticuerpos primarios durante una hora y con los secundarios durante 8 min. El cromógeno diaminobencidina (DAB) se utilizó para la visualización del complejo activado a través de un precipitado marrón. Como contratinción se utilizó la hematoxilina dando coloración azul en los núcleos celulares. Las lecturas se tomaron de forma automática con el sistema ACIS III de DAKO verificándose por dos patólogos. El porcentaje de tinción de las células tumorales se consideró como +/- (<10% de las células marcadas), + (10% a 25% de las células marcadas), ++ (25% a 50% de las células marcadas), +++ (> 50% de las células marcadas). Para el análisis estadístico se definió como +/- y + como grupo de baja expresión y ++ y +++ como de alta expresión.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las curvas de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) se generaron mediante el método de Kaplan-Meier y se compararon con la prueba de log-rank. Las tablas de contingencia se analizaron por χ^2 y la prueba exacta de Fisher. Todos los cálculos se realizaron utilizando el software estadístico SPSS, versión 15.0. La significación estadística se fijó en el nivel de $p < 0,05$.

Resultados

ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR Y EXPRESIÓN PROTEICA DE MGMT

Tanto el estado de metilación del promotor de MGMT como su expresión proteica se determinaron en 76 de la 78 tumores (97,4%). La metilación del promotor de MGMT se detectó en el 44,7% (34/76) de las muestras de GBM analizadas por MSP (Figura 4A). Respecto a la expresión proteica de MGMT (Figura 4B): 11 (14,5%) casos mostraron +/-, 31 pacientes (40,8%) presentaron +, 19 (25%) ++ y 15 (19,7%) casos +++. Para el análisis de correlación entre el estado de metilación del promotor de MGMT y la expresión de la proteína MGMT, los pacientes se clasificaron en pacientes con biopsias con baja expresión (42, 55,3%) y alta expresión (34, 44,7%) de MGMT. Dentro de los 42 tumores con el promotor de MGMT no metilado, 22 (52,4%) mostraron baja expresión de MGMT y 20 (47,6%) mostraron alta expresión, mientras que, dentro de los 34 tumores con el promotor de MGMT metilado, 20 (58,8%) mostraron baja expresión y 14

(41,2%) mostraron alta expresión de MGMT. De este modo, no observamos correlación entre la expresión proteica de MGMT y el estado de metilación del promotor de MGMT.

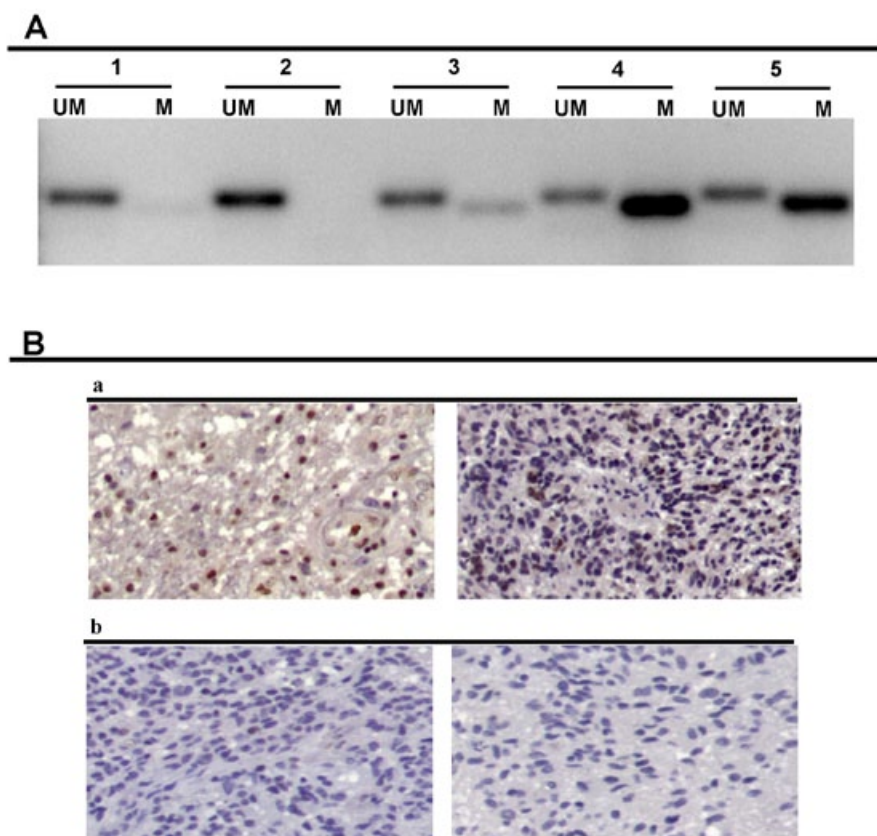


FIGURA 4. Estado de metilación del promotor y expresión proteica de MGMT en pacientes con GBM. A) Imagen representativa de la PCR específica de metilación para el promotor de MGMT. Cabe destacar que los pacientes 1 y 2 no presentan metilación del promotor de MGMT ya que no muestran amplificación en el carril M a diferencia del resto de pacientes analizados en la imagen. M, *methylated*, UM, *unmethylated*. B) Fotomicrografías representativas ilustrando: a) muestras de GBM con tinción positiva para MGMT mostrando la formación de precipitado marrón en el núcleo celular. b) muestras con tinción negativa de GBM (20x). Figura modificada de Melguizo *et al.* [45].

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CD133.

La expresión proteica de CD133 se pudo evaluar en 75 de los 78 pacientes (96,2%). Dentro de las 75 muestras evaluadas 15 (20%), 26 (34,7%), 27 (36%) y 7 (9,3%) mostraron los valores +/-, +, ++ y +++ respectivamente (**Figura 5**). Para analizar si existe asociación entre la expresión proteica de MGMT y CD133 se agruparon los pacientes con baja expresión (41, 54,7%) y alta expresión (34, 45,3%). No observamos correlación entre la expresión proteica de MGMT y CD133.

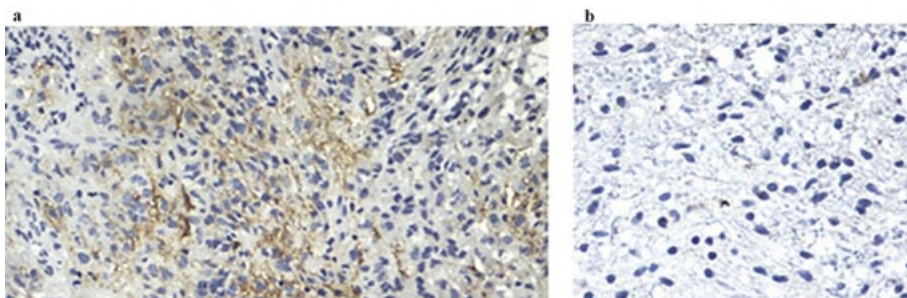


FIGURA 5. Fotomicrografía representativa. a) muestras de GBM con tinción positiva para CD133 y b) muestras con tinción negativa de CD133 (20x). Podemos destacar que en este caso CD133 no presenta tinción nuclear ni citoplasmática marcando solo la región de la membrana plasmática de las células positivas (modificada de Melguizo *et al.* [45]).

INFLUENCIA DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR MGMT, EXPRESIÓN PROTEICA DE MGMT Y CD133 EN LA SUPERVIVENCIA GLOBAL.

El análisis estadístico mostró una correlación significativa entre la SG y el estado de metilación del promotor de MGMT (**Figura 6**). De este modo, la SG media en los pacientes de GBM con el promotor de MGMT metilado fue significativamente superior a los pacientes con el promotor de MGMT no metilado siendo de 19 meses (Intervalo de confianza (I.C.) del 95%: 9,6 a 28,4 meses) y 13 meses (IC del 95%, 10,5 a 15,4 meses) respectivamente ($p = 0,031$).

Por el contrario, la SG no mostró diferencias estadísticamente significativas al utilizar las curvas de Kaplan-Meier entre los pacientes con alta y baja expresión proteica de MGMT (log-rank test, $p = 0,894$). La media de la SG de los pacientes con alta expresión proteica de MGMT fue de 12 meses (IC del 95%, 8,8 a 15,2

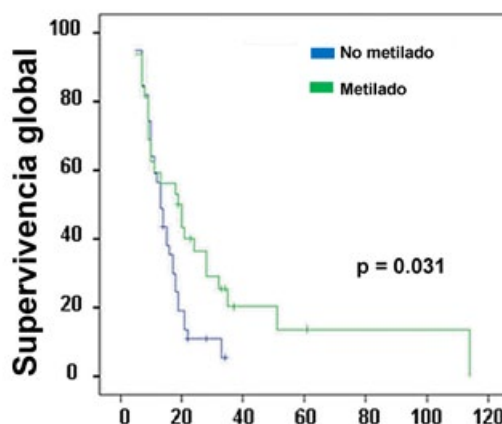


FIGURA 6. Curvas de Kaplan-Meier entre supervivencia global y estado de metilación del promotor de MGMT. Modificada de Melguizo et al. [45].

meses) y de 13 meses en los pacientes con baja expresión de MGMT (IC del 95%, 8,1 a 17,9 meses).

Por otra parte, al analizar la expresión proteica de CD133, no observamos diferencias significativas entre los tumores con alta y baja expresión (log-rank, $p = 0,787$). De este modo, los pacientes con alta expresión de CD133 tenían una SG de 14 meses (IC del 95%, 9,1 a 18,9 meses) y de 13 meses (IC del 95%, 6,1 a 19,8 meses) en pacientes con baja expresión proteica de CD133 (log-rank, $p = 0,787$).

INFLUENCIA DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR MGMT Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MGMT Y CD133 EN LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN

Al analizar el valor pronóstico del estado de metilación del promotor de MGMT en la SLP apreciamos mediante las curvas de Kaplan-Meier que la SLP fue de 8 meses (IC del 95%, 4-12 meses) en los pacientes con el estado del promotor de MGMT metilado y de 6 meses (IC 95%, 2.6 a 9.4 meses) para los pacientes con el promotor de MGMT no metilado mostrando diferencias significativas en ambas poblaciones (log-rank, $p = 0,036$) (Figura 7). Por el contrario, no observamos diferencias significativas en la SLP entre los pacientes con baja y alta expresión pro-

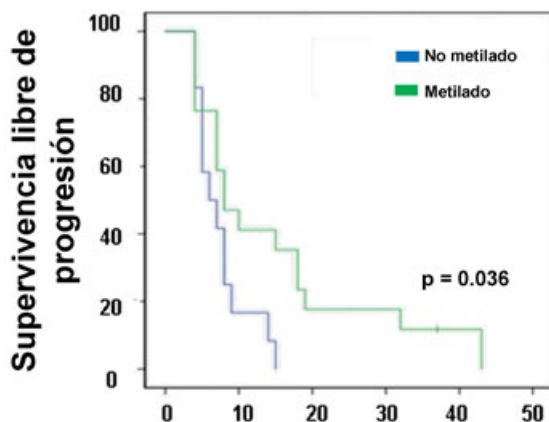


FIGURA 7. Curvas de Kaplan-Meier entre supervivencia libre de progresión y estado de metilación del promotor de MGMT Modificada de Melguizo *et al.* [45].

teica de MGMT apreciando una SLP media de 7 meses (IC 95%, 5.2 a 8.8 meses) en los pacientes con alta expresión proteica de CD133 y de 8 meses (IC 95%, 6.7 a 9.3 meses) en los pacientes con alta expresión proteica de CD133 ($p = 0,118$).

Discusión

A pesar de los numerosos intentos de encontrar nuevas terapias más efectivas contra el GBM, la TMZ combinada con radioterapia tras la resección tumoral sigue siendo la terapia más efectiva. Nuestros resultados muestran el valor pronóstico del estado de metilación de MGMT tanto para la supervivencia global como la supervivencia libre de progresión tras el tratamiento combinado de TMZ con radioterapia. Estudios previos [46] han observado una fuerte correlación entre el estado de metilación del promotor de MGMT y el efecto de la TMZ como tratamiento, lo que permite confirmar los resultados previos que correlacionaban la inactivación de MGMT y la respuesta clínica a agentes alquilantes [44,47]. A pesar de esto, Criniere *et al.* [48] mostraron que mientras que el estado de metilación del promotor de MGMT no tenía impacto en la supervivencia global de los pacientes con GBM tratados con agentes alquilantes, sí tenía un impacto en los tratados con quimio-radioterapia, lo que podría sugerir que el valor pronóstico del estado de metilación de MGMT depende de la modalidad terapéutica que recibe el paciente. De hecho, Weller *et al.* [49] analizaron los pacientes con GBM tratados con radioterapia

pia, con quimioterapia y con ambos mostrando que únicamente el estado de metilación tuvo valor pronóstico para la SG y la SLP únicamente en los pacientes tratados con radioterapia y TMZ concomitante.

En el lado opuesto, existen varios estudios que exponen que el estado de metilación del promotor del gen MGMT no es un factor pronóstico fiable en respuesta a agentes alquilantes en GBM [50]. Por ejemplo, en el estudio de Yachi *et al.* [51] no se pudo establecer la correlación supervivencia *versus* MGMT en un mayor número de pacientes y mostraron que ni a nivel de estado de metilación ni inmunohistoquímico tenía implicaciones pronósticas en los pacientes con GBM.

Por otra parte, analizamos la relación entre la expresión proteica y el estado de metilación del promotor MGMT. Nuestro estudio a pesar de realizarse mediante inmunohistoquímica con cuantificación digital para evitar la variabilidad del observador [52] mostró claramente que no hay correlación entre ambas variables moleculares apoyando los resultados observados por otros autores [53,54]. Esto lleva a cuestionar la idea de que la regulación del gen MGMT depende exclusivamente de su estado de metilación. En esta dirección, hay autores que presentan datos al respecto mostrando discordancias entre el estado de metilación del promotor MGMT y los niveles de expresión de ARNm [55]. Todo esto sugiere que el proceso de regulación de MGMT es algo más complejo de lo que se había pensado inicialmente. Respecto a esto, ya hay estudios que profundizan y analizan los distintos patrones de metilación en MGMT tanto a nivel de secuenciación como de MSP [56,57].

Respecto a CD133 es un marcador utilizado ampliamente para el marcaje de CSC en GBM [26]. Esta pequeña porción celular se ha asociado a la resistencia del tumor frente a tratamientos como la quimioterapia y radioterapia [38,58], de este modo, la hipótesis inicial planteada era que el resultado clínico está inversamente asociado con la presencia de CSC CD133+. Sin embargo, nuestros resultados muestran que el valor pronóstico tanto para la SG como para la SLP en esta población es nulo. La metodología usada en los distintos estudios es muy diversa observando estudios que analizan CD133 mediante PCR cuantitativa, inmunohistoquímica o citometría. Varios ejemplos analizan la expresión proteica de CD133 en tumores gliales del sistema nervioso central [59-61], asociándola con un mal pronóstico. Otros autores mostraban evidencias de que el fenotipo CD133+ se correlacionaba con la quimioradiorresistencia y supervivencia en pacientes con GBM [62]. En el lado opuesto, varios autores defienden que la alta expresión de CD133 se asocia a un mejor pronóstico en GBM [63,64]. En este contexto, nuestro estudio aporta más pruebas a que CD133 no tiene ninguna incidencia en el valor pronóstico de los pacientes con GBM como en el estudio de Kim *et al.* [65].

Estudios previos *in vitro*, han mostrado que uno de los mecanismos responsables de la quimiorresistencia frente a la TMZ en las CSC (CD133+) en GBM es la O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) [38]. Nuestro estudio no ha observado asociación entre MGMT y CD133 en ninguna de sus variables moleculares.

Conclusiones

1. Tanto la supervivencia global como la supervivencia libre de enfermedad se correlacionan significativamente al estado de metilación de MGMT, pudiendo observar que los pacientes de GBM con el promotor de MGMT metilado tienen una supervivencia global y libre de progresión superior a los pacientes con el promotor de MGMT no metilado.
2. En la población de estudio analizada, CD133 no tiene ninguna influencia en la supervivencia libre de progresión.
3. Finalmente, no observamos ninguna asociación significativa entre CD133 y el estado de metilación o expresión proteica de MGMT.

Referencias

1. Jemal A, Siegal R, Ward E, et al. Cancer statistics 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007;57;43-66.
2. Pilo B, Dalmau J, Ronsensfeld M. Actualización del tratamiento de gliomas: *Neurología.* 2007;22;159-169.
3. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, et al. Primary brain tumours in adults. *Lancet.* 2003; 361:323-331.
4. Hu J, Jiang C, Ng HK, et al. Genome-wide allelotyping study of primary glioblastoma multiforme. *Chin Med J (Engl).* 2003;116(4):577-83.
5. Zheng H, Ying H, Yan H, et al. Pten and p53 converge on c-Myc to control differentiation, self-renewal, and transformation of normal and neoplastic stem cells in glioblastoma. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008; 73:427-37.
6. Sun T, Warrington NM, Luo J, et al. Sexually dimorphic RB inactivation underlies mesenchymal glioblastoma prevalence in males. *J Clin Invest.* 2014;124(9):4123-33.
7. Clarke J, Penas C, Pastori C, et al. Epigenetic pathways and glioblastoma treatment. *Epigenetics.* 2013;8(8):785-95.
8. Bordignon KC, Neto M, Ramina R, et al. Patterns of neuroaxis dissemination of gliomas: suggestion of a classification based on magnetic resonance imaging findings. *Surg Neurol.* 2006;65;472-477.
9. Jawahar A, Weilbaecher C, Shorter C, et al. Multicentric glioblastoma multiforme determined by positron emission tomography: a case report. *Clin Neurol Neurosurg.* 2003;106;38-40.
10. Elmariah S, Huse J, Mason B, et al. Multicentric Glioblastoma Multiforme in a patient with BRCA-1 invasive Breast cancer. *The Breast Journal* 2006;12;470-474.
11. Showalter T, Andre J, Andrews D, et al. Multifocal glioblastoma multiforme: prognostic factors and patterns of progression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;69;820-824.
12. Mishra HB, Haran RP, Singh JP. Multicentric gliomas: Two case reports and a review of the literature. *Br J Neurosurg.* 1990;4;535-539.
13. Pell MF, Revesz T, Thomas DG. Multicentric malignant glioma. *Br J Neurosurg* 1991;5;631-634.

14. Kyritsis AP, Levin VA, Yung WK. Imaging patterns of multifocal gliomas. *Eur J Radiol.* 1993;16:163-170.
15. Mirzoeva OK, Kawaguchi T, Pieper RO. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex interacts with the mismatch repair system and contributes to temozolomide-induced G2 arrest and cytotoxicity. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:2757-2766.
16. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:997-1003.
17. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999;59:793-797.
18. Dong Z, Pang J, Ng MH, et al. Identification of two contiguous minimally deleted regions on chromosome 1p36.31-p36.32 in oligodendrogial tumours. *Br J Cancer* 2004;91:1105-1111.
19. Wedge SR, Porteous JK, Glaser MG, et al. In vitro evaluation of temozolomide combined with X-irradiation. *Anticancer Drugs.* 1997;8:92-97.
20. Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2001;61:1957-1963.
21. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10:459-466.
22. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997;90:5013-5021.
23. Lehnus KS, Donovan LK, Huang X, et al. CD133 glycosylation is enhanced by hypoxia in cultured glioma stem cells. *Int J Oncol* 2013;42(3):1011-7.
24. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002-5012.
25. Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, et al. Prominin, a novel microvillus-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12425-12430.
26. Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:14720-14725.
27. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, et al. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34⁺ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 2003;101:168-172.
28. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396-401.
29. Wang J, Li ZH, White J, et al. Lung Cancer Stem Cells and Implications for Future Therapeutics. *Cell Biochem Biophys* 2014; 69(3): 389-98.
30. Zhou J, Hu Z, Li Z, et al. The role of liver cancer stem cells in donor liver allocation for patients with hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med* 2013; 125(6): 24-30.
31. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007; 1(3): 313-23.

32. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445(7123):106-10.
33. Li F, Tiede B, Massagué J, et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res* 2007;17(1):3-14.
34. Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W, et al. Colon cancer stem cells: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol* 2013;19(20):2997-3006.
35. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007;58:267-84.
36. Boman BM, Wicha MS, Fields JZ, et al. Symmetric division of cancer stem cells--a key mechanism in tumor growth that should be targeted in future therapeutic approaches. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81(6):893-8.
37. Boman BM, Fields JZ, Cavanaugh KL, et al. How dysregulated colonic crypt dynamics cause stem cell overpopulation and initiate colon cancer. *Cancer Res* 2008;68(9):3304-13.
38. Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*. 2006;2;5:67.
39. Pantic I. Cancer stem cell hypotheses: impact on modern molecular physiology and pharmacology research. *J Biosci*. 2011;36(5):957-61.
40. Peitzsch C, Kurth I, Kunz-Schughart L, et al. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiother Oncol*. 2013;108(3):378-87.
41. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *Cancer Staging Handbook: From the AJCC Cancer Staging Manual*: Springer Publishing Company 2010.
42. Pilati P, Mocellin S, Bertazza L, et al. Prognostic value of putative circulating cancer stem cells in patients undergoing hepatic resection for colorectal liver metastasis. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19(2): 402-8.
43. Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, et al. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol*. 1990;8:1277-1280.
44. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000;343:1350-1354.
45. Melguizo C, Prados J, González B, et al. MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy. *J Transl Med*. 2012;17;10:250.
46. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, et al. RTOG 0525: a randomized phase III trial comparing standard adjuvant temozolomide (TMZ) with a dose-dense (dd) schedule in newly diagnosed glioblastoma (GBM). *J Clin Oncol*. 2011;29(suppl);abstr 2006.
47. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, et al. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res* 2004;10:4933-4938.
48. Criniere E, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, et al. MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities. *J Neurooncol*. 2007;83:173-179.
49. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective

- translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol.* 2009;27:5743–5750.
50. Blanc JL, Wager M, Guilhot, J, et al. Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. *J Neurooncol.* 2004;68:275–283.
 51. Yachi K, Watanabe T, Ohta T, et al. Relevance of MSP assay for the detection of MGMT promoterhypermethylation in glioblastomas. *Int J Oncol.* 2008;33:469–475.
 52. Arazi Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, et al. Quantitative digital assessment of MGMT immunohistochemical expression in glioblastoma tissue. *Brain Tumor Pathol.* 2011;28:25–31.
 53. Rodriguez FJ, Thibodeau SN, Jenkins RB, et al. MGMT immunohistochemical expression and promoter methylation in human glioblastoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008;16:59–65.
 54. Uno M, Oba-Shinjo SM, Camargo AA, et al. Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. *Clinics* 2011;66:1747–1755.
 55. Kreth S, Thon N, Eigenbrog S, et al. O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation. *PLoS One* 2011;18:e17156.
 56. Shah N, Lin B, Sibenaller Z, et al. Comprehensive analysis of MGMT promoter methylation: correlation with MGMT expression and clinical response in GBM. *PLoS One* 2011;6:e16146.
 57. Mokarram P, Zamani M, Kavousipour S, Naghibalhossa, et al. Different patterns of DNA methylation of the two distinct O6-methylguanine-DNA methyltransferase (O6-MGMT) promoter regions in colorectal cancer. *Mol Biol Rep* 2013, 40:3851–3857.
 58. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444:756–760
 59. Beier D, Wischhusen J, Dietmaier W, Hau P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP: CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendrogial tumors. *Brain Pathol.* 2008, 18:370–377.
 60. Zhang M, Song T, Yang L, et al. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008;27:85–92.
 61. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res.* 2008;14:123–129.
 62. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, et al. Stem cell-related «self-renewal» signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2008;26:3015–3024.
 63. Pallini R, Ricci-Vitiani L, Montano N, et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis. *Cancer* 2011;117:162–174.
 64. Joo KM, Kim SY, Jin X, et al. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastoma. *Lab Invest.* 2008;88:808–815.
 65. Kim KJ, Lee KH, Kim HS, et al. The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas. *Neuropathology* 2011;31:494–502.

Influencia de la proteína MGMT y el sistema de reparación de errores MMR en la resistencia al tratamiento con TMZ en pacientes con Glioblastoma Multiforme

**Perazzoli G, Ortiz R, Prados J, Álvarez PJ,
Caba O, Cabeza L, Melguizo C**

Resumen

El Glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor astrocítico más común en la población adulta, con una supervivencia global inferior al año y una progresión rápida de la enfermedad. El tratamiento inicial se basa en la cirugía, tras la cual se somete al paciente a radioterapia y quimioterapia adyuvante con la temozolamida (TMZ) como fármaco de elección. A pesar que el uso de este quimioterápico supuso un avance en el tratamiento del GBM, existen pacientes en los que no mejora el pronóstico y desarrollan un mecanismo de resistencia al mismo.

Numerosos estudios apuntan hacia una relación entre la proteína metil-guanina-O6-DNA metiltransferasa (MGMT) y la resistencia a la TMZ. Aunque los estudios hasta ahora se centraban únicamente en esta proteína reparadora, recientemente se están estudiando diferentes mecanismos de resistencia, como es el sistema de reparación de errores (MMR), que podrían estar relacionados con el fenómeno de resistencia al tratamiento con TMZ. El objetivo de este trabajo ha sido analizar y agrupar los últimos conocimientos y avances en el estudio de resistencia a la TMZ, mediada tanto por la proteína MGMT como por el sistema MMR.

Introducción

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) representan el 2-3% del total de las neoplasias en adultos. El Glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario más frecuente (Figura 1) y maligno de entre todas las neoplasias de la glía [1]. La tasa de supervivencia de los pacientes con GBM es de 9 a 12 meses de tal manera que desde el diagnóstico solo un 3% de los pacientes sobrevive 5 años [2]. La baja supervivencia es consecuencia de ciertos factores de riesgo que

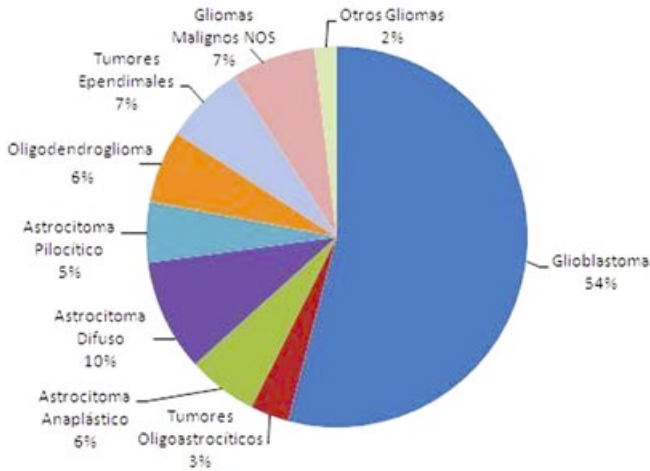


FIGURA 1. Distribución de los tumores primarios de Cerebro y Gliomas del sistema nervioso central por subtipos histológicos. (N=90,828). Figura obtenida de [1].

incrementan la agresividad del tumor y por tanto afectan a la supervivencia global del paciente.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los tumores del sistema nervioso en cuatro grupos dependiendo de su agresividad y malignidad. El GBM se encuentra dentro del grado IV, caracterizado por incluir lesiones de crecimiento rápido, anaplasia muy pronunciada, tendencia a la necrosis y, en general, está asociado con evolución pre quirúrgica y posquirúrgica rápida de la enfermedad y alta tasa de mortalidad. Los síntomas presentados por estos pacientes se pueden dividir en dos grupos. En primer lugar están aquellos síntomas causados por un aumento de la presión intracraneal, siendo las cefaleas el síntoma inicial y más común en más del 50% de todos los pacientes con glioma cerebral, y en segundo lugar están los síntomas causados por la localización del tumor. Estos se producen en mayor medida por la destrucción e irritación del parénquima cerebral, estando los efectos asociados al área afectada [3]. El 75% de los pacientes con oligodendrogliomas y el 65% de los pacientes con gliomas presentan crisis comiciales, siendo esta la segunda manifestación clínica más frecuente en el momento del diagnóstico.

El diagnóstico inicial de glioblastoma se basa en pruebas de imagen radiológicas, los estudios mediante tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética nuclear (RMN) para determinar la localización y extensión de la lesión, así como su relación con las estructuras adyacentes [4]. Además se realiza un

estudio histológico del tumor mediante el uso de técnicas poco invasivas como son la búsqueda de marcadores tumorales o células malignas en el líquido cefalorraquídeo, aunque en los casos donde es posible es conveniente obtener una muestra de tejido tumoral.

El tratamiento del GBM está basado en la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. La cirugía es clave para el tratamiento de los gliomas, ya que por un lado permite obtener una muestra para el diagnóstico histológico, y por otro lado reduce la masa tumoral. Se obtiene así, una reducción inmediata de la presión intracraneal lo que permite una mejor acción de los tratamientos posteriores como son la radioterapia y la quimioterapia. Existen estudios que ponen de manifiesto que el volumen de resección del tumor influye en la supervivencia frente al mismo [5–7]. Tras la cirugía se somete al paciente a radioterapia y quimioterapia con la temozolamida (TMZ) como quimioterápico adyuvante, incrementando significativamente la supervivencia de los pacientes [8]. La temozolamida es un agente alquilante de segunda generación, de administración oral con un 100% de biodisponibilidad por esta vía en un tiempo máximo de 90 minutos [9]. La preferencia de la TMZ por tejido tumoral puede ser explicable debido al pH del entorno cancerígeno. La TMZ es muy estable al pH ácido del estómago aunque una vez en contacto con el pH básico de la sangre y de los tejidos, espontáneamente, se hidroliza dando lugar al metabolito activo, el monometiltiriazaboimidazolcarboxamida (MTIC). Este no penetra bien en el cerebro, así que rápidamente se rompe para formar el ión reactivo metildiazonio [10]. El pH del tejido tumoral es más alto en comparación con el tejido cerebral circundante, por lo que esta activación dependiente de pH está favorecida, pudiendo dar lugar a una terapia dirigida [11]. El mecanismo de acción de la temozolamida consiste en inhibir la replicación del ADN. Durante la transformación a su metabolito activo (MTIC) se produce un proceso oxidativo con formación de un inestable metildiazonio, que es rápidamente escindido en nitrógeno molecular (N_2) y un ion carbonio CH_3^+ que actúa como elemento “alquilante”. Este ion carbonio provoca la metilación de algunas bases del ADN (fundamentalmente la guanina). Además, en el proceso oxidativo que conduce a la activación del fármaco puede formarse otros radicales libres capaces de provocar degradación del ADN e incluso roturas a nivel cromosómico. Estas lesiones conllevan a la detención de la célula en la fase G2-M, y en última instancia, a la muerte celular.

A pesar de lo prometedor del tratamiento, existen pacientes en los que se dan recidivas o progresiones del tumor, creándose una resistencia frente al mismo. Esta resistencia puede darse por múltiples factores entre los que se encuentran los sistemas de reparación del DNA. Estos sistemas son los encargados de mantener la integridad del genoma neutralizando los múltiples e intensos daños en el DNA que son producidos por agentes físicos y químicos, por lo que son capaces de reparar el DNA dañado por el agente alquilante utilizado para tratar estos tumores, la TMZ. Entre estos mecanismos se encuentran la proteína MGMT y del sistema de reparación de errores MMR que pasaremos a explicar con más detalle.

MGMT

MGMT (O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferasa) es una proteína reparadora del DNA que protege al genoma de la célula de los efectos mutagénicos de los agentes alquilantes como la TMZ (9). El gen que codifica la proteína MGMT está situado en el cromosoma 10 y está regulado epigenéticamente mediante procesos de metilación de su promotor. Cuando las regiones CpG del promotor de MGMT se encuentran sin metilar la polimerasa se une dando lugar a la expresión de la proteína. Sin embargo, cuando las regiones CpG del promotor se encuentran metiladas la polimerasa no encuentra sitios de unión y por tanto no dará lugar a la proteína, produciéndose un silenciamiento de la misma (figura 2) [12].

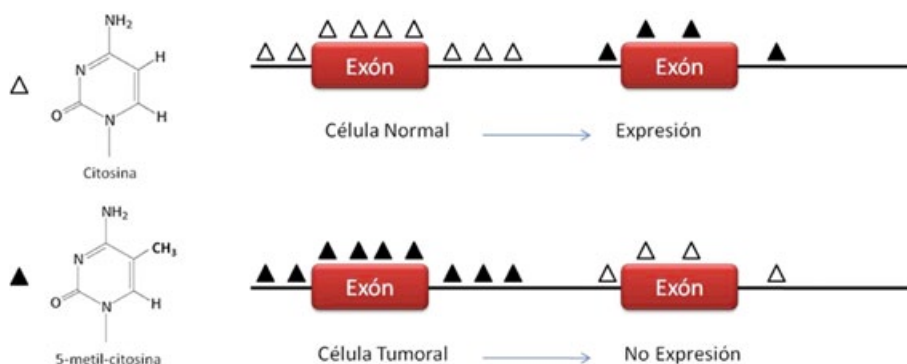


FIGURA 2. Representación esquemática de la distribución de la metilación en células normales y tumorales.

En las células humanas, MGMT tiene una expresión constitutiva aunque variable en algunos tejidos y su función es la reparación del DNA eliminando residuos alquilantes introducidos a nivel del átomo O₆ de la guanina ,provocados por la acción de agentes alquilantes como la TMZ. El mecanismo de reparación mediado por MGMT consiste en una transferencia de estos grupos alquilantes a un sitio activo interno representado por un residuo de cisteína en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Esta transferencia inactiva de forma irreversible la molécula de MGMT, por lo que a esta proteína también se la denomina enzima suicida no pudiendo ser reutilizado el MGMT y debiendo ser resintetizado *de novo* por las células [13,14] (Figura 3).

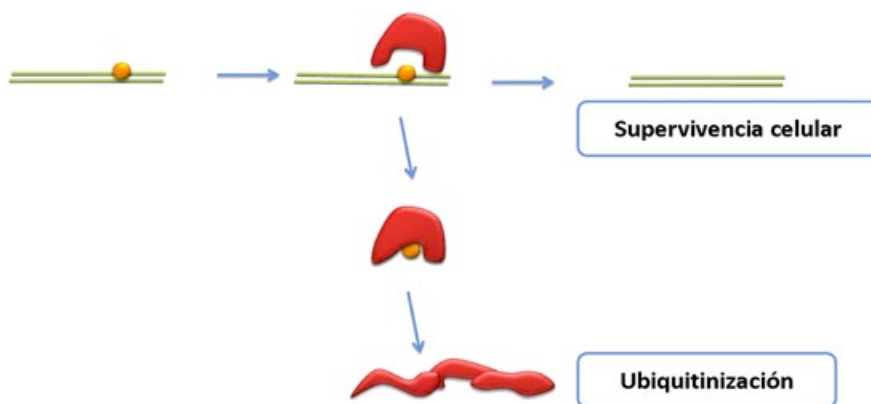


FIGURA 3. Mecanismo de reparación del ADN por el enzima MGMT. Modificado de [15].

Numerosos estudios han observado una correlación entre los niveles de MGMT y el nivel de respuesta a la quimioterapia con TMZ, sugiriendo que los niveles de MGMT se podrían usar como un factor predictivo de la respuesta al tratamiento, pudiéndose seleccionar aquellos pacientes que tuvieran más probabilidades de beneficiarse de la quimioterapia con fármacos alquilantes, evitando así a los pacientes someterse a un tratamiento con una baja probabilidad de éxito y con una gran número de efectos secundarios adversos. En los estudios de Brandes y cols., [16] sobre 103 pacientes con GBM se concluyó que aquellos pacientes que presentaban metilación en el promotor de MGMT presentaban una media de supervivencia de 46 meses frente a los 17 meses que presentaban aquellos pacientes sin metilación en el promotor de MGMT, así como que la metilación, en los pacientes sometidos a radioterapia y TMZ seguido de administración adyuvante de TMZ, era un factor pronóstico independiente para la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en estos pacientes. Weller y cols., en 2009 [17], analizaron 189 pacientes tratados con radioterapia y temozolamida en los que la metilación de MGMT también fue un factor pronóstico significativo mejorando la supervivencia de los pacientes de 6,8 meses a 12,5. El estudio de Spiegl-Kreinecker y cols., [18], demuestra un incremento en la supervivencia de 20 meses en aquellos pacientes que no expresan MGMT frente a aquellos en los que sí se expresa, cuando los dos grupos de pacientes se someten a un tratamiento con TMZ.

Sin embargo, a pesar de que estos estudios demuestran una mejor evolución en pacientes que presentaban silenciamiento epigenético del MGMT, existen otros trabajos en los que se pone de manifiesto que esta correlación no se cumple en todos los casos, como en el estudio de Hegi y cols., [19] donde no todos los pacientes con GBM con metilación del promotor de MGMT respondían satisfacto-

riamente al tratamiento. Estos resultados contradictorios obtenidos podrían indicar que la enzima de reparación MGMT puede no ser el único mecanismo de reparación del ADN involucrado en la respuesta al tratamiento con agentes alquilantes en los pacientes con glioblastoma, dando pie al análisis de otros mecanismos implicados en la reparación del DNA, como el sistema MMR.

MMR

El sistema de reconocimiento de errores MMR está implicado en múltiples procesos celulares como son la regulación del ciclo celular, la apoptosis dependiente de p53, la estabilidad genética y además en el reconocimiento y reparación de aquellos errores producidos durante la replicación de DNA y que no han sido reparados por las polimerasas [20].

El sistema MMR está compuesto por varias subunidades que se unen formando heterodímeros para realizar su función. El mecanismo de reparación del DNA por el sistema MMR consta de varias etapas consecutivas [21] (figura 4). La primera etapa consiste en el reconocimiento y unión del error. Esta etapa se lleva a cabo por las subunidades MSH2-MSH6 o MSH2-MSH3 dependiendo del tipo de error que se reconozca. Este heterodímero, recluta al complejo MLH1-PMS2 con quien forma un complejo terciario el cual recluta las proteínas necesarias para producir un gap. La segunda etapa consiste en la escisión llevada a cabo por la exonucleasa EXO1, tras la cual se llega a la tercera etapa consistente en la reparación y ligación por la ligasa LIG1 [15].

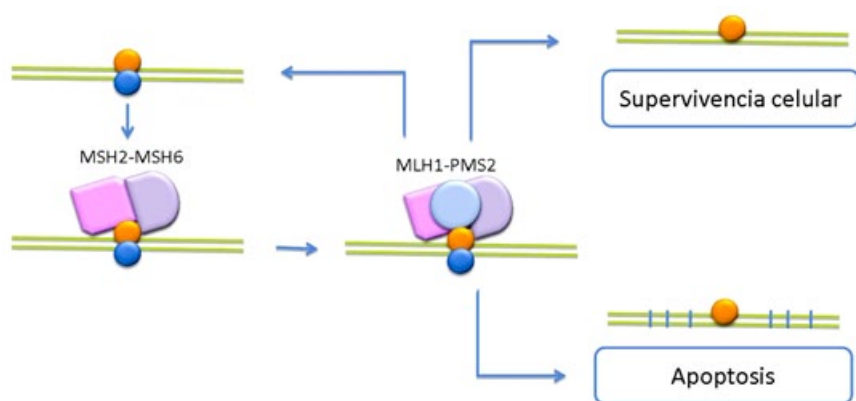


FIGURA 4. Reparación de apareamientos erróneos humano. Modificado de [15].

Cuando el daño no puede ser reparado el sistema MMR conduce a la célula hacia un punto de control y posteriormente la célula entra en un proceso de muerte celular. Actualmente no está claro cómo se inicia este punto de control existiendo varios mecanismos que pretenden explicarlo. Uno de ellos consiste en generar ciclos de reparación del DNA repetitivos tras los cuales la hebra acabaría dañada generando una rotura en la doble hélice, ejerciendo un efecto citotóxico sobre la célula. En este mecanismo MMR ejercería una acción indirecta. En cambio hay otros modelos que sugieren una acción directa de MMR, que sería el encargado de reconocer el daño en el DNA y tras esto reclutar proteínas asociadas que serían las encargadas de transmitir una señal para la activación de uno o más puntos de control del ciclo celular [22].

En el caso del glioblastoma, en aquellos pacientes con el promotor de MGMT metilado, es decir, sin expresión de MGMT, se ha relacionado el tratamiento con TMZ con una deficiencia en el sistema MMR [23,24]. También se ha demostrado en diferentes tipos tumorales que deficiencias en la expresión de los genes que forman parte del complejo MMR, sobre todo de los genes MSH2, MSH6 y PMS2, podrían explicar las variaciones en la resistencia frente a la TMZ entre las diferentes líneas tumorales, con independencia de la expresión basal de MGMT. Existen estudios como el de Yip y cols., de 2009 [25] sobre el complejo MMR, especialmente sobre el gen MSH6, concluyen en que una bajada de la expresión de este gen se correlaciona con un aumento en la resistencia frente a la TMZ. Otros como el de Cahill en 2007 [26] asocian resistencia frente a TMZ con delecciones de MSH6. Felsbergen en 2011 [27], determina que existe una disminución de la expresión de MMR en glioblastomas recurrentes. Además, en estudios recientes se ha demostrado que la expresión de MLH1 está relacionada con recurrencia en tumores e incremento de resistencia a TMZ en diferentes líneas de glioblastoma [28]. Por otro lado, existen trabajos como el de Maxwell y cols., (2008) [29] en el que no encuentran una relación entre una ausencia de MMR y la resistencia a la TMZ a nivel clínico.

Conclusiones

Debido a los fenómenos de resistencia farmacológica que están presentes en muchos tipos tumorales, se han realizado numerosos estudios para poder determinar cuáles son estos y su mecanismo de acción. En los tumores del sistema nervioso central, como es el caso del glioblastoma multiforme, el mecanismo más frecuentemente estudiado es la proteína MGMT, proteína reparadora del DNA, pudiendo considerarse factor pronóstico al tratamiento. Sin embargo, existe una gran controversia con el uso exclusivo de esta proteína como marcador de resistencia, ya que existen artículos en los que a pesar de no aparecer esta proteína, no se refleja en un incremento de la supervivencia de los pacientes. Esta controversia favorece que cada vez más en los últimos años aparezcan estudios de otros posibles meca-

nismos de resistencia, como el sistema MMR, que también parece tener relevancia en la resistencia al tratamiento. Estos estudios aportan nuevos datos sobre la resistencia en este tipo de tumor, lo que puede abrir al entendimiento de otros mecanismos de resistencia aún desconocidos y que pueden estar favoreciendo la aparición de recidivas y el fracaso del tratamiento actual. Por lo tanto, aún no está claro que mecanismo de resistencia o en qué medida la combinación de estos mecanismos es la que produce la resistencia frente al tratamiento, pero cada vez se cuenta con más datos y más estudios cuya integración en el futuro permitirá dilucidar posibles dianas moleculares para generar una mayor supervivencia a los pacientes y éxito en el tratamiento.

Bibliografía

1. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-Oncol.* 2012;14 Suppl 5:v1-49.
2. Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol.* 2005;25(1):1-7.
3. Bordignon KC, Neto MC, Ramina R, de Meneses MS, Zazula AD, de Almeida LGMP. Patterns of neuroaxis dissemination of gliomas: suggestion of a classification based on magnetic resonance imaging findings. *Surg Neurol.* 2006;65(5):472-7; discussion 477.
4. Jawahar A, Weilbaecher C, Shorter C, Stout N, Nanda A. Multicentric glioblastoma multiforme determined by positron emission tomography: a case report. *Clin Neurol Neurosurg.* 2003;106(1):38-40.
5. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg.* 2001;95(2):190-8.
6. Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, Mirmanoff RO, Weller M, Cairncross JG, et al. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol.* 2008;9(1):29-38.
7. Stupp R, Hegi ME. Methylguanine methyltransferase testing in glioblastoma: when and how? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2007;25(12):1459-60.
8. Mirmanoff R-O, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann R-D, Fisher B, et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006;24(16):2563-9.
9. Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, De Vecchis L. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc.* 2007;56(4):275-87.
10. Koukourakis GV, Kouloulis V, Zacharias G, Papadimitriou C, Pantelakos P, Maravelis G, et al. Temozolomide with Radiation Therapy in High Grade Brain Gli-

- mas: Pharmaceuticals Considerations and Efficacy;A Review Article. *Molecules*. 2009;14(4):1561-77.
11. Saleem A, Brown GD, Brady F, Aboagye EO, Osman S, Luthra SK, et al. Metabolic activation of temozolomide measured in vivo using positron emission tomography. *Cancer Res*. 2003;63(10):2409-15.
 12. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000;343(19):1350-4.
 13. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*. 1999;59(4):793-7.
 14. Blough MD, Zlatescu MC, Cairncross JG. O6-methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells. *Cancer Res*. 2007;67(2):580-4.
 15. Liu L, Gerson SL. Targeted modulation of MGMT: clinical implications. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006;12(2):328-31.
 16. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;67(2):139-52.
 17. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27(34):5743-50.
 18. Spiegl-Kreinecker S, Pirker C, Filipits M, Lötsch D, Buchroithner J, Pichler J, et al. O6-Methylguanine DNA methyltransferase protein expression in tumor cells predicts outcome of temozolomide therapy in glioblastoma patients. *Neuro-Oncol*. 2010;12(1):28-36.
 19. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(25):4189-99.
 20. Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie*. 2002;84(1):27-47.
 21. Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*. 2011;94(2):166-200.
 22. O'Brien V, Brown R. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis*. 2006;27(4):682-92.
 23. Happpold C, Roth P, Wick W, Schmidt N, Florea A-M, Silginer M, et al. Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. *J Neurochem*. 2012;122(2):444-55.
 24. Zhang J, Stevens MFG, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5(1):102-14.
 25. Yip S, Miao J, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL, et al. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009;15(14):4622-9.

26. Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB, et al. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007;13(7):2038-45.
27. Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M, et al. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2011;129(3):659-70.
28. Shinsato Y, Furukawa T, Yunoue S, Yonezawa H, Minami K, Nishizawa Y, et al. Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma. *Oncotarget.* 2013;4(12):2261-70.
29. Maxwell JA, Johnson SP, McLendon RE, Lister DW, Horne KS, Rasheed A, et al. Mismatch repair deficiency does not mediate clinical resistance to temozolomide in malignant glioma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2008;14(15):4859-68.

Células madre mesenquimales de tejido adiposo: Obtención, caracterización y diferenciación neurogénica

**Jiménez-Luna C, Prados J, Berdasco M,
Vélez C, Rama AR, Melguizo C**

Resumen

Existen numerosas enfermedades degenerativas que afectan al sistema nervioso central (SNC) las cuales albergan no sólo el obstáculo que supone la limitada capacidad de autorreparación del SNC, sino además, que en muchos casos las posibilidades de tratamiento y curación son escasas. La creciente investigación con células madre se postula como una herramienta muy prometedora en este campo.

El tejido adiposo se ha utilizado ampliamente para el aislamiento de células madre mesenquimales humanas (hASCs) tanto por su facilidad de obtención como por su plasticidad. Son muchos los estudios que muestran la capacidad de las hASCs para diferenciarse *in vitro*, hacia linajes celulares no mesodérmicos como son los tipos celulares del sistema nervioso.

Nuestro estudio preliminar se centra en aislar y caracterizar hASCs y valorar morfológicamente, como una primera aproximación, su diferenciación hacia células del SNC mediante un protocolo de inducción. Hemos aislamos hASCs a partir de lipoaspirado de grasa, las hemos cultivamos bajo condiciones estándar comprobando el inmunofenotipo de la población de hASCs mediante el uso de CD73+, CD90+, CD105+, CD45–, CD34– y CD133– y hemos usado un protocolo de inducción neurogénica que incluía su exposición a factores de crecimiento.

Nuestros resultados muestran que las hASCs *in vitro* expuestas a protocolo de inducción adquieren características morfológicas similares a los tipos celulares propios del SNC. Este estudio constituye un primer paso en la diferenciación de hASC que se continuará con su caracterización molecular y funcional y que podría permitirnos disponer de una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de diferentes patologías del SNC.

Introducción

El deterioro natural del cuerpo humano, consecuencia de la influencia del ambiente y del control genético, se traduce en la aparición de diversas lesiones y

enfermedades, muchas de las cuales están sometidas a un proceso de degeneración. Dado el incremento notable en la incidencia de enfermedades degenerativas, muchas de ellas consecuencia del aumento en la longevidad de la población, el trasplante es, en muchos casos, la única salida terapéutica. Sin embargo, existen numerosas enfermedades degenerativas que afectan al sistema nervioso central (SNC) las cuales albergan no sólo el obstáculo que supone la limitada capacidad de autorreparación de este, sino además, que en muchos casos las posibilidades de tratamiento y curación son escasas, ya que, por el momento, el trasplante de tejido nervioso es inabordable desde el punto de vista clínico. La creciente investigación con células madre se postula como una herramienta muy prometedora en este campo.

El trasplante de células madre como técnica terapéutica se viene empleando desde hace muchos años, siendo el ejemplo más claro el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPHs) o trasplante de médula ósea. En 1949, *Jacobson y cols.* [1] demostraron la recuperación de ratones sometidos a una dosis letal de radiación tras la protección del bazo. Las experiencias atómicas de Hiroshima y Nagasaki llevaron al estudio de la asociación entre la radiación y el desorden hematopoyético [2]. En 1951, *Lorenz y cols.* consiguieron restaurar, mediante células de médula ósea de otro ratón, la hematopoyesis de ratones irradiados [3]. El primer intento de TCPHs en humanos (6 pacientes) no tuvo gran éxito [4, 5], aunque más tarde, el empleo de TCPHs isólogo restableció la función medular en enfermos de leucemia [6]. En 1959, *Mathé* realiza el primer TCPHs alogénico duradero [7]. Tras estos primeros pasos y un largo recorrido, se abordó la medicina regenerativa en el SNC, especialmente tras encontrar localizaciones específicas, en este sistema, donde tiene lugar el proceso de renovación celular [8].

En enfermedades neurodegenerativas, el uso de células madre, con su capacidad intrínseca para diferenciarse y autorrenovarse, ha despertado gran interés [9]. A pesar del enorme potencial que encierran las células madre embrionarias (ESCs), su uso terapéutico se encuentra limitado por cuestiones políticas y éticas [10, 11]. Por el contrario, las hASCs aisladas del propio paciente no presentan estos problemas y poseen propiedades autólogas [12]. El tejido adiposo ha sido una de las fuentes utilizadas para la obtención de hASCs, tanto por su facilidad de obtención como por su plasticidad [13-15]. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse, *in vitro*, hacia tipos celulares de origen mesodérmico (adipogénicos, miogénicos, osteogénicos, condrogénicos) [16-18], sin embargo, son muchos los estudios que muestran, además, su potencial para diferenciarse hacia linajes no mesodérmicos, como son los tipos celulares del sistema nervioso [19-22]. En el año 2000, dos grupos describieron las primeras diferenciaciones neuronales *in vitro* a partir de células de médula ósea [23, 24]. Posteriormente, las investigaciones en este campo se extendieron a células madre procedentes de otros tejidos, como es el caso de las hASCs [25, 26]. Varios estudios han demostrado que los protocolos de inducción neuronal químicos son menos eficientes que los basados en factores de crecimiento [27]. *Kingham y cols.* [28] demostraron que las hASCs

pueden diferenciarse a células de Schwann mediante cultivo con factores tróficos gliales. Por su parte, *Lo furno y cols.* [22] diferenciaron hASCs hacia neuronas maduras, mediante exposición a un medio en el que habían crecido, previamente, células del nervio olfatorio y células de neuroblastoma.

Este estudio representa el inicio de una investigación para valorar la eficiencia en la diferenciación de hASCs humanas hacia células del SNC, empleando un protocolo de inducción específico y analizando los cambios morfológicos provocados por el tratamiento.

Material y métodos

ASLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y CULTIVO CELULAR

Tras obtener un consentimiento informado escrito, y de acuerdo con las pautas del Comité Ético del Hospital de Nuestra Señora de la Salud (Granada, España), se tomaron muestras de tejido adiposo abdominal, mediante lipoaspirado, de donadores sanos con edades comprendidas entre 30 y 55 años. El posterior procesamiento del tejido adiposo se realizó, dentro de las cuatro horas posteriores a la intervención, en el Laboratorio de Cultivo Celular del Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER) de Granada (España).

El protocolo de procesamiento seguido [29] se describe a continuación. Tomamos 600 ml de tejido adiposo a los que les realizamos 2 lavados con una solución de *buffer* fosfato salino (PBS), centrifugando a 400 x g, durante 10 min, a una temperatura de 4 °C, con objeto de eliminar los restos de sangre. El tejido fue sometido a digestión enzimática mediante incubación con una solución de colagenasa tipo I al 0.075% (Invitrogen SA) y 1% de albúmina de suero bovina (Sigma) preparada en PBS, previamente filtrada por una membrana de nylon, durante 1 hora a 37 °C y agitación constante. Una vez finalizado el periodo de incubación, la actividad enzimática fue neutralizada por la adición de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen SA) a la mezcla y posterior centrifugación a 400 x g, durante 10 min, a una temperatura de 4 °C. Descartamos el sobrenadante, que contenía las gotas lipídicas y así obtuvimos el botón celular de la fracción vascular estromal. Resuspendimos el *pellet* en medio DMEM suplementado con 10% FBS y 1% de solución de antibióticos con 10.000 U/ml penicilina y 10 mg/ml estreptomycin (Sigma), y centrifugamos nuevamente a 400 x g, durante 10 min, a 4 °C. Realizamos este paso de lavado 2 veces. Resuspendimos nuevamente el *pellet* en medio de proliferación, pero en esta ocasión, pasamos la mezcla por un filtro con tamaño de poro 100 µm para deshacernos de los restos celulares de mayor tamaño. Posteriormente repetimos el paso de centrifugación. La fracción celular obtenida se cultivó en frascos de cultivo a una densidad de 1000 células/cm², en el medio de proliferación descrito previamente, a 37 °C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Tras 24

horas de incubación, se realizó el primer cambio de medio con el fin de eliminar los eritrocitos residuales. Se realizaron cambios de medio cada 3 días hasta que el cultivo alcanzó el 70-80% de confluencia, momento en el que se realizaron los pases celulares pertinentes. Únicamente las células en pases 5-6 se utilizaron para nuestros experimentos.

CARACTERIZACIÓN DE hASCs

Una vez establecida la línea celular, y tras mantenerla en cultivo de 3 a 4 semanas, comprobamos, mediante citometría de flujo, si exhibían el inmunofenotipo característico de la población de hASCs (CD73+, CD90+, CD105+, CD45–, CD34– y CD133–).

DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE hASCs *IN VITRO*

Una vez que las hASCs alcanzaron 70-80% de confluencia se les realizó un lavado con PBS, con el fin de eliminar los residuos de suero procedentes del medio de proliferación. Para la diferenciación *in vitro* de las hASCs, hacia linajes celulares de SNC, empleamos un protocolo de inducción neuronal que incluía la incubación de las células en presencia de un medio suplementado con distintos factores de crecimiento, durante un periodo de 15 días. El medio de diferenciación se basó en el descrito por *Bae y cols.* [30], que incluye el uso de HAM'S F-12 suplementado con 1% de solución de antibióticos (10.000 U/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomycin), 20 ng/ml de factor de crecimiento de hepatocitos humano (HGF), 20 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Sigma). Como control negativo se utilizaron hASCs cultivadas en medio de proliferación. El protocolo de inducción incluyó la renovación del medio de cultivo cada 3 días.

Durante el proceso de diferenciación, realizamos un seguimiento de los cambios morfológicos celulares cada 2 días, los cuales fueron visualizados y fotografiados mediante microscopía óptica, de forma que al final del proceso, fue posible realizar una comparación morfológica entre las hASCs inducidas y la población celular considerada como control.

RESULTADOS

AÍSLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE hASCs

Las células aisladas a partir de lipoaspirado y cultivadas en medio de proliferación durante 3-4 semanas se consideraron hASCs, ya que cumplían con los criterios establecidos por el Comité de células madre mesenquimales y de tejido de la Socie-

dad Internacional de Terapia Celular [31]. Las hASCs mantenidas en condiciones de cultivo estándar, con medio de proliferación, presentaron adherencia al plástico, mostrando un crecimiento celular en monocapa que adquirió morfología fibroblastoide (figura 1A). Además, la caracterización mediante citometría de flujo determinó un inmunofenotipo característico de células madre mesenquimales, siendo positivas para los marcadores CD73, CD90 y CD105, y por el contrario, negativas para los marcadores CD45, CD34 y CD133 (figura 1B).

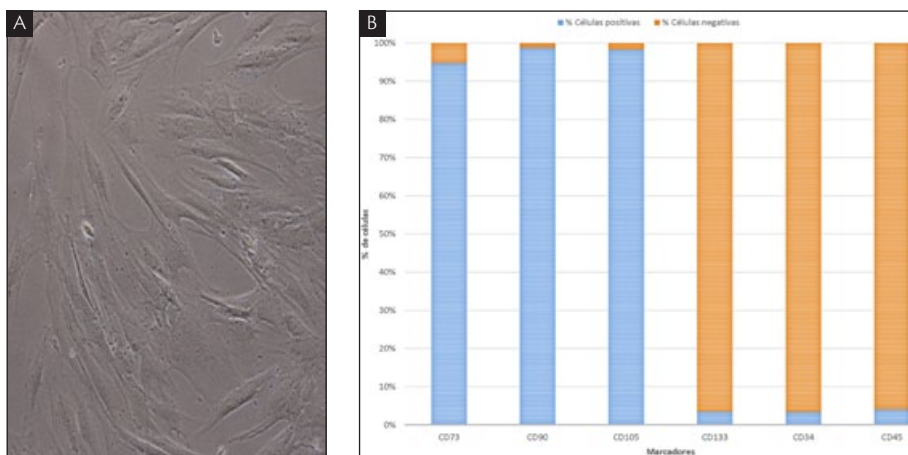


FIGURA 1. a) Imagen de microscopía óptica de hASCs en cultivo con medio de proliferación. b) Resultado de la caracterización de hASCs mediante citometría de flujo.

DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE HASCS IN VITRO

Partiendo de una población homogénea de hASCs y tras la aplicación del protocolo de diferenciación indicado, observamos diferencias comportamentales en cuanto a la morfología celular. El proceso de inducción neuronal dio como resultado notables diferencias morfológicas respecto a la población celular empleada como control, adquiriendo una morfología celular más estrecha, encontrándose procesos ramificados en algunas células y mostrando una disposición del crecimiento celular en grupos celulares o núcleos, conectados entre sí por numerosas prolongaciones celulares (figura 2), alejándose así del tipo morfológico fibroblástico propio de las hASCs.

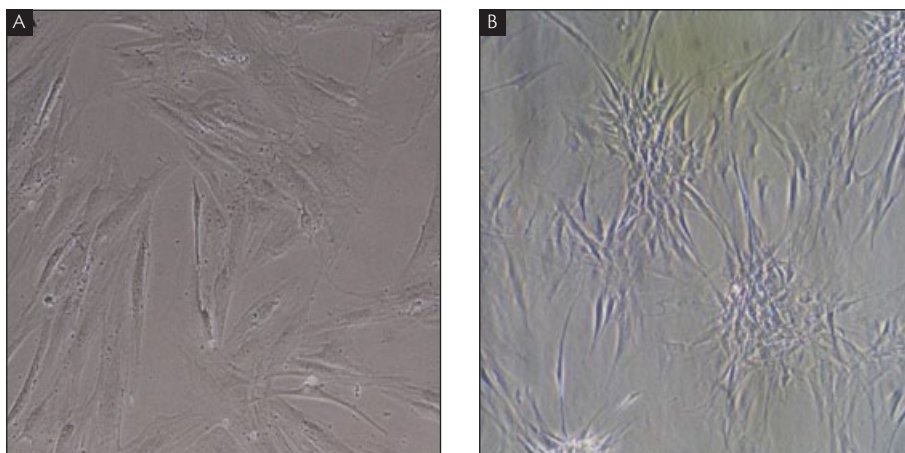


FIGURA 2. Imágenes de microscopía óptica. a) hASCs en cultivo con medio de proliferación. b) hASCs inducidas tras 15 días en cultivo con medio de diferenciación neuronal.

Discusión

Muchos estudios han demostrado cómo la exposición de las hASCs a condiciones de cultivo específicas, origina su diferenciación hacia células osteogénicas, adipogénicas, condrogénicas y miogénicas [13, 29, 32, 33], lo que no ha provocado mucha controversia debido a que las hASCs son de origen mesodérmico [34]. No obstante, son numerosas las investigaciones que analizan la capacidad de las hASCs para diferenciarse, *in vitro*, hacia linajes celulares no mesodérmicos, como son las células del SNC [13, 28, 33, 35], demostrando que las hASCs tienen una plasticidad intrínseca para diferenciarse hacia tipos celulares propios de otras capas germinales.

Nuestro estudio se centra en valorar la eficiencia en la diferenciación de hASCs hacia células del SNC, empleando un protocolo de inducción, sometiendo las células, durante 15 días, a un medio cuya composición incluía distintos factores de crecimiento, tales como EGF y VEGF, que estimulan la proliferación, *in vitro*, de células derivadas de tejido cerebral [36-40] y HGF, que entre otras funciones, se une al receptor de la tirosina kinasa [41], el cual, junto con sus ligandos, se expresa en el tejido neural, jugando un importante papel en la supervivencia, diferenciación y regeneración de neuronas [30].

Es interesante cómo las hASCs reaccionaron a dicho medio modificando su morfología, adquiriendo un aspecto similar al de tipos celulares propios del SNC, observándose células más estrechas, la presencia ocasional de ramificaciones y una disposición del crecimiento celular en núcleos celulares, conectados entre sí por

numerosas prolongaciones. Existen estudios que muestran modificaciones morfológicas en las hASCs inducidas, *in vitro*, hacia tipos celulares neurogénicos, adquiriendo características típicas del linaje nervioso. Los experimentos de *Tio y cols.* [9] en células madre mesenquimales procedentes de sangre de cordón umbilical, originaron el desarrollo de proyecciones bipolares o multipolares similares a neuritas, tras exposición a un medio de diferenciación específico. *Chen y cols.* [42] demostraron, en células madre mesenquimales de origen murino, no sólo la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales hacia neuronas, sino además, que dicha diferenciación era más efectiva sometiendo a las células a condiciones de microgravedad. Otros investigadores, basan sus estudios en este campo, en dos pasos de diferenciación, el primero de ellos hacia células madre neuronales (NSC) y el segundo hacia la diferenciación final. Tal es el caso de *Hermann y cols.* [43], quienes realizaron una primera fase de diferenciación, a partir de células madre mesenquimales procedentes de médula ósea, hacia células con características moleculares de NSC, las cuales crecieron formando pequeñas esferas flotantes (neuroesferas), y una segunda etapa de diferenciación hacia células gliales y neuronas, cada una con sus respectivos medios.

Con todos estos datos, podemos concluir que dada su facilidad de obtención y su elevado rendimiento celular, el tejido adiposo podría ser una fuente importante de células madre mesenquimales, cuya capacidad de diferenciación hacia múltiples linajes celulares las convierten en un instrumento prometedor en el campo de la medicina regenerativa. Nuestros resultados muestran los primeros pasos en la diferenciación de hASCs, *in vitro*, hacia células precursoras de sistema nervioso, lo que podría permitirnos esclarecer los mecanismos moleculares implicados en la neurogénesis, constituyendo una potencial herramienta terapéutica.

Perspectivas futuras

Este estudio corrobora la plasticidad de las hASCs y la adquisición de características fenotípicas propias de células de sistema nervioso, previa exposición a medio de diferenciación. Sin embargo, la notable extensión de ramificaciones por parte de las hASCs inducidas y el resto de cambios obtenidos a nivel morfológico, no son, por sí solos, concluyentes para confirmar la diferenciación neuronal [9, 44-46]. Por este motivo, sería recomendable realizar ensayos adicionales, con el fin de determinar si los cambios observados constituyen verdaderos indicios de diferenciación neuronal. Estudios a nivel molecular y funcional permitirán confirmar la diferenciación neuronal *in vitro* de las hASCs.

El análisis del perfil de expresión génica, mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), es una de las técnicas más empleadas por los investigadores para estudiar marcadores moleculares típicos de células nerviosas. En este sentido, *Cardozo y cols* [47] analizaron varios marcadores propios de distintas fases del proceso neurogénico, como son el marcador de NSC nestina (NES); marcadores neuronales como

la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) y la enolasa específica de neuronas (NSE); o la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) típica de astrocitos. Sus resultados muestran valores de expresión que se correlacionan con las fases de la neurogénesis, correspondiéndose positivamente con el grado de diferenciación. Por su parte, *Jang y cols.* [33] advirtieron un aumento de expresión, de genes relacionados con canales iónicos, tras un proceso de diferenciación basado en la exposición a forskolina y factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). Por otro lado, el estudio del estado funcional de las células inducidas mediante la técnica de fijación de membranas (*patch clamp*) permite determinar la conductividad de la membrana, bajo condiciones específicas, y en consecuencia el carácter excitable de la célula [43, 48, 49].

Conclusión

La prometedora herramienta que suponen las hASCs en el campo de las terapias dirigidas al SNC, explica el enorme interés, tanto científico como social, que suscitan las investigaciones en esta área. Consideramos este trabajo como el inicio de un camino, que nos permitirá seguir investigando, hacia el desarrollo de un método de obtención y diferenciación neuronal de hASCs. Esto podría ayudar a abrir las puertas a un mejor conocimiento del proceso de neurogénesis y los principales cambios que este implica. Dada la complejidad del SNC será, sin duda, un desafío fascinante intentar dar explicación a cuestiones hoy día sin responder.

Referencias

1. Jacobson LO, Marks EK. Role of the spleen in radiation injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949; 70:7440.
2. Gratwhol A. Historical aspects of chronic graft versus host disease. In: Vogelsang GB, Pavletic SZ, editors. *Chronic graft versus host disease: interdisciplinary management*. New York, NY: Cambridge University Press; 2009. pp. 3-7.
3. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Sheldon E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951; 12:197-201.
4. Thomas Ed, Lochte Hl Jr, Lu Wc, Ferrebee Jw. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957; 257(11):491-6.
5. León-Rodríguez E. Editorial. El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. *Rev Invest Clin* 2005; 57 (2): 129-131.
6. Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH, FERREBEE JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest*. 1959; 38:1709-16.
7. Mathe G, Jammet H, Pendic B, Schwarzenberg L, Duplan Jf, Maupin B, Latarjet R, Larrieu Mj, Kalic D, Djukic Z. Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation. *Rev Fr Etud Clin Biol*. 1959; 4(3):226-38.

8. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 2004; 41(5):683-6.
9. Tio M, Tan KH, Lee W, Wang TT, Udolph G. Roles of db-cAMP, IBMX and RA in aspects of neural differentiation of cord blood derived mesenchymal-like stem cells. *PLoS ONE*. 2010; 5(2): e9398.
10. Lenoir N. Europe confronts the embryonic stem cell research challenge. *Science* 2000; 287(5457):1425-1427.
11. Young FE. A time for restraint. *Science* 2000; 287(5457):1424.
12. Kang SK, Shin MJ, Jung JS, Kim YG, Kim CH: Autologous adipose tissue derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev* 2006; 15(4):583-594.
13. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JL, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13(12):4279-95.
14. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005; 87(1):125-8.
15. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. 2005; 52(8):2521-9.
16. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004; 14(4-6):311-24.
17. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005; 54(3):132-41.
18. Musumeci G, LoFurno D, Loreto C, Giuffrida R, Caggia S, Leonardi R, Cardile V. Mesenchymal stem cells from adipose tissue which have been differentiated into chondrocytes in three-dimensional culture express lubricin. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011; 236(11):1333-41.
19. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 294(2):371-9.
20. Gimble J, and Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003; 5(5):362-9.
21. Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: Isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med*. 2005; 140(1):138-43.
22. Lo Furno D, Pellitteri R, Graziano AC, Giuffrida R, Vancheri C, Gili E, Cardile V. Differentiation of human adipose stem cells into neural phenotype by neuroblastoma- or olfactory ensheathing cells-conditioned medium. *J Cell Physiol*. 2013; 228(11):2109-18.
23. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000; 164(2):247-56.

24. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop, DJ., Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 2000; 61, 364–370.
25. Zuk, PA, Zhu M, Ashjian P, DeUgarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13(12):4279-95.
26. Ashjian PH1, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111(6):1922-31.
27. Ahmadi N, Razavi S, Kazemi M, Oryan S. Stability of neural differentiation in human adipose derived stem cells by two induction protocols. *Tissue Cell.* 2012; 44(2):87-94.
28. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* 2007; 207(2):267-274.
29. Berdasco M, Melguizo C, Prados J, Gómez A, Alaminos M, Pujana MA, Lopez M, Setien F, Ortiz R, Zafra I, Aranega A, Esteller M. DNA methylation plasticity of human adipose-derived stem cells in lineage commitment. *Am J Pathol.* 2012; 181(6):2079-93.
30. Bae KS, Park JB, Kim HS, Kim DS, Park DJ, Kang SJ. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J.* 2011; 52(3):401-12.
31. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315–317.
32. Casteilla L, Dani C. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab* 2006; 32(5 Pt 1):393-401.
33. Jang S, Cho HH, Cho YB, Park JS, Jeong HS. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol.* 2010; 11:25.
34. Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World J Stem Cells.* 2014; 6(3): 312–321.
35. Case J, Horvath TL, Howell JC, Yoder MC, March KL, Srour EF. Clonal multilineage differentiation of murine common pluripotent stem cells isolated from skeletal muscle and adipose stromal cells. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1044:183-200.
36. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 1992; 12:4565-74.
37. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255:1707-10.
38. Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 1996; 175:1-13.
39. Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:8591-5.
40. Carpenter MK, Cui X, Hu ZY, Jackson J, Sherman S, Seiger A, Wahlberg LU. In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol.* 1999; 158:265-78.

41. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*. 1989; 342:440-3.
42. Chen J, Liu R, Yang Y, Li J, Zhang X, Li J, Wang Z, Ma J. The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons. *Neurosci Lett*. 2011; 505(2):171-5.
43. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci*. 2004; 117(Pt 19):4411-22.
44. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res*. 2004; 77(2):174-91.
45. Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res*. 2004; 77(2):192-204.
46. Croft AP, Przyborski SA. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem Cells*. 2006; 24(8):1841-51.
47. Cardozo AJ, Gómez DE, Argibay PF. Neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: Relevance of different signaling molecules, transcription factors, and key marker genes. *Gene*. 2012; 511(2):427-36.
48. Belinsky GS, Rich MT, Sirois CL, Short SM, Pedrosa E, Lachman HM, Antic SD. Patch-clamp recordings and calcium imaging followed by single-cell PCR reveal the developmental profile of 13 genes in iPSC-derived human neurons. *Stem Cell Res*. 2014; 12(1):101-18.
49. Kim HS, Kim J, Jo Y, Jeon D, Cho YS. Direct lineage reprogramming of mouse fibroblasts to functional midbrain dopaminergic neuronal progenitors. *Stem Cell Res*. 2014; 12(1):60-8.



Genes del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal y de la neurotransmisión serotoninérgica se asocian con depresión mayor

Ching-López A, Rivera M, Cervilla J,
McKenney K, Molina E, Gutiérrez B

Resumen

La depresión mayor (DM) es un trastorno mental grave, frecuente en población general, que para el año 2020 la OMS estima será la segunda causa de discapacidad en el mundo. El estudio GranadΣp es un estudio epidemiológico transversal sobre salud mental en Andalucía cuyo objetivo principal es identificar factores de riesgo genéticos y ambientales para DM. En el contexto de dicho estudio, se analizaron 91 polimorfismos genéticos candidatos para DM y se estudió su posible asociación con la enfermedad en la muestra GranadΣp.

La muestra está formada por 711 individuos de la población general adulta de la provincia de Granada. Todos fueron ampliamente evaluados para variables clínicas, psicológicas, socio-demográficas, de estilo de vida, estrés psicosocial y otros factores ambientales. Además, se recogió una muestra biológica para su posterior análisis genético. Se usó el diagnóstico DSM-IV de DM como variable resultado. Se realizó un análisis de regresión logística asumiendo un modelo genético aditivo para evaluar la asociación entre los SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) y el diagnóstico de DM. Se estableció el umbral de significación en $P < 0.01$ tras corregir por comparaciones múltiples.

Un polimorfismo (rs623580) situado en el gen de la triptófano hidroxilasa 1 (*TPH1*), una variante intergénica (rs9526236) situada aguas arriba del receptor de serotonina 2A (*HTR2A*) y cinco polimorfismos (rs17689966, rs173365, rs7209436, rs110402, rs242924) situados en el receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina (*CRHR1*), mostraron una tendencia hacia la asociación con DM ($P < 0.01$). Los haplotipos TATGA y TAT de los SNPs del *CRHR1* se encontraron significativamente más representados en casos que en controles (OR=1.68; 95%CI: 1.16–2.42, $P=0.006$).

Nuestros resultados parecen apoyar la implicación de los sistemas hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) y serotoninérgico en la susceptibilidad genética a la DM. Serán necesarios estudios futuros con un mayor tamaño muestral para la validación y replicación de estos hallazgos.

Introducción

La depresión mayor (DM) es el trastorno psiquiátrico más común, con estimaciones de prevalencia vida que varían del 8 al 12% según diferentes estudios [1, 2]. Es un trastorno mental grave caracterizado por una tristeza persistente y anhedonia, así como por alteraciones en las funciones vegetativas, psicomotoras y cognitivas, pudiendo afectar de forma profunda a la capacidad de una persona para funcionar o llevar a cabo actividades cotidianas de la vida diaria [3]. Este trastorno es responsable de una gran proporción de la discapacidad global y según la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2020, la depresión será la segunda causa más importante de discapacidad en el mundo, solo por detrás de las enfermedades cardiovasculares [3, 4].

Como han puesto de manifiesto los estudios de familia y gemelos, que reportan estimaciones de heredabilidad que varían del 17 al 75% con una media del 37%, los factores genéticos juegan, sin lugar a dudas, un papel importante en la etiología de la DM [5-7]. Ya que la DM constituye un gran problema de salud pública [3], la identificación de los factores genéticos subyacentes ha sido reconocida recientemente como uno de los mayores retos a los que se enfrentan los investigadores en este campo [8]. Una mejor comprensión de las bases genéticas de la DM podría aportar nuevos conocimientos sobre la etiología de dicha enfermedad, y guiarnos a la hora de realizar mejores diagnósticos, tratamientos y estrategias de prevención.

Una de las aproximaciones más utilizadas en la búsqueda de los genes de la DM han sido los estudios de asociación genética, especialmente adecuados cuando la enfermedad estudiada es de naturaleza compleja, como es el caso que nos ocupa. Este tipo de estudios tienen más poder que otras estrategias, por ejemplo los estudios de ligamiento, para detectar genes de efecto menor que probablemente interactúan entre sí y con otros factores de tipo no genético para perfilar en cada persona un perfil de riesgo único de enfermar [9]. Normalmente el diseño de los estudios de asociación se corresponde al de un estudio caso-control, donde se compara la frecuencia de un posible factor de riesgo en personas no emparentadas afectadas por una misma enfermedad con la frecuencia observada en personas sanas del mismo grupo étnico, la población control. En los estudios de asociación genética el factor de riesgo es siempre un marcador o polimorfismo genético normalmente localizado en un gen candidato para la enfermedad. Si el polimorfismo analizado es significativamente más frecuente en el grupo de enfermos que en el de controles, diremos que existe una asociación entre dicho alelo y la enfermedad. Los resultados se dan en términos de riesgo relativo, como *odds ratio* (OR), una medida estadística que nos da idea del tamaño del efecto. En definitiva no es más que una forma de expresar cuántas veces es más probable padecer una enfermedad si se porta el marcador que si no se porta.

Los genes candidatos en que se basan estos estudios pueden ser candidatos biológicos o posicionales. Los primeros son genes relacionados, de forma conocida o hipotética, con rutas metabólicas implicadas en la enfermedad o con la síntesis de proteínas diana de fármacos, mientras que los segundos son cualquier gen que se localice dentro de una región cromosómica sugerente de estar ligada a la enfermedad. De entre los genes candidatos biológicos para DM, destaca el gen del transportador de serotonina (*SERT* o *SLC6A4*) y, concretamente, la variante polimórfica 5HTTLPR por ser la más estudiada en estudios de asociación genética y por tratarse probablemente del polimorfismo asociado a DM de forma más robusta. El polimorfismo 5HTTLPR (*5-hydroxytryptamine transporter gene-linked polymorphic region*) se encuentra en el promotor del gen del transportador *SERT* y se caracteriza por presentar dos alelos o variantes (alelo s y alelo l) frecuentes a nivel poblacional pero con distinta actividad funcional, siendo el alelo s el asociado a una menor capacidad transcripcional del gen y a un riesgo incrementado para depresión y mala respuesta al tratamiento antidepressivo [10].

Además, se han reportado otros hallazgos prometedores procedentes de estudios de asociación genética llevados a cabo sobre ese y otros genes candidatos. Una reciente revisión de Flint & Kendler (2014) muestra que de los casi 200 genes candidatos para DM estudiados, solo unos pocos generaron resultados robustos. Esta revisión también incluye un metaanálisis que se centra en 26 de esos genes candidatos para DM, de los cuales siete se asociaron de forma estadísticamente significativa con DM (*SLC6A4*, *APOE*, *DRD4*, *GNB3*, *HTR1A*, *MTHFR* y *SLC6A3*) [11].

Aunque en sus inicios los estudios de asociación genética se centraron en genes candidatos, desde 2007 son los estudios de genoma completo los que han acaparado la atención. A pesar de que se han publicado muchos estudios de asociación del genoma completo (GWAS) en los últimos años, ninguno de ellos ha identificado de forma robusta ningún *locus* nuevo [11]. La falta de resultados concluyentes, sobre todo por la falta de replicación en muestras independientes de hallazgos sugerentes, podría ser explicada, al menos en parte, por una vulnerabilidad genética causada por el efecto conjunto de múltiples alelos de efecto menor, difíciles de detectar con una aproximación por GWAS, en la que además las muestras estudiadas tienen que ser extraordinariamente amplias y bien caracterizadas. De nuevo, emerge como una buena opción, el uso de diseños caso-control en los que se teste la asociación de determinados genes candidatos y la enfermedad y en los que se repliquen hallazgos previos.

Esto es precisamente lo que se hizo en el presente trabajo. En el contexto de un estudio epidemiológico sobre trastornos mentales (el estudio GranadΣp), diseñamos un *array* customizado que contenía 91 polimorfismos tipo SNP relevantes para DM. Los SNPs se seleccionaron teniendo en cuenta los genes candidatos clave previamente descritos en la literatura por su asociación con DM, nuevos genes de

rutas teóricamente importantes y los *top hits* de los GWAS en DM. El objetivo de este estudio era evaluar (y replicar en algunos casos) la asociación de esos 91 SNPs candidatos con DM.

Métodos

CONTEXTO DEL ESTUDIO Y DISEÑO

El estudio GranadΣp es un estudio epidemiológico transversal basado en una muestra relativamente grande representativa de la población adulta que vive en la provincia de Granada. El GranadΣp se diseñó como un estudio piloto independiente dentro de uno de mayor envergadura que se puso en marcha posteriormente en toda Andalucía (el estudio PISMA-ep). En ambos se usaron los mismos métodos de evaluación. Los objetivos principales de ambos son establecer las tasas de prevalencia de los trastornos psiquiátricos mayores en Andalucía e identificar factores de riesgo tanto genéticos como ambientales para dichos trastornos.

La recogida de la muestra se llevó a cabo entre octubre de 2011 y diciembre de 2012 en la provincia de Granada (N=711). Todos los individuos en este estudio fueron seleccionados al azar utilizando la base de datos de usuarios del Sistema Andaluz de Salud (SAS), que se estima cubre el 98% de la población. Los participantes fueron evaluados para variables clínicas, psicológicas, socio-demográficas, de estilo de vida, estrés psicosocial, y otros aspectos ambientales. Los participantes que también accedieron a participar en el análisis genético facilitaron el consentimiento informado específico para donar una muestra de saliva. Los individuos eran en su mayoría españoles con ascendencia española, aunque la nacionalidad española no era un criterio de inclusión y las personas procedentes de otros países europeos con ascendencia europea también fueron incluidos en el estudio genético.

El estudio GranadΣp fue aprobado por la "Comisión de Ética en Investigación de la Universidad de Granada". La metodología común de ambos estudios, GranadΣp y PISMA-ep, ha sido previamente descrita en detalle [12].

LA MUESTRA

La recogida de la muestra se realizó por un muestreo por conglomerados en dos etapas con estratificación de las unidades primarias de muestreo dependiendo de si eran rurales o urbanas. La ruralidad se determinó según el índice de ruralidad de los municipios andaluces [13]. La media del índice de ruralidad para todos los municipios de Andalucía se tuvo en cuenta para hacer las distinciones entre municipios rurales y urbanos.

En la primera etapa se recogió la muestra en los municipios por muestreo por conglomerados con probabilidad proporcional al tamaño (PPT). Los *clusters* se seleccionaron con asignación proporcional en cada estrato. El número total de municipios seleccionados representaba aproximadamente el 15% del total de municipios en la provincia de Granada. En la segunda etapa los individuos que constituían la muestra se seleccionaron usando un muestreo aleatorio simple.

Ochocientos nueve participantes no institucionalizados de la población general que vivían en la provincia de Granada accedieron a formar parte del estudio. Todas las entrevistas se realizaron entre octubre de 2011 y septiembre de 2012. Para poder estimar una prevalencia de trastorno mental del 2% con una precisión de $\pm 0.8\%$ para un intervalo de confianza del 95% la muestra se estimó en 1,176 participantes.

Todos los individuos de edades entre 18 y 80 años fueron seleccionados para su participación en el estudio, divididos en cuatro grupos de edad. Los criterios de exclusión fueron: estar fuera del rango de edad, haber vivido menos de un año en la provincia de Granada, no ser capaz de comunicarse fluidamente en español, estar demasiado enfermo para completar la entrevista, tener diagnóstico de demencia o retraso mental, vivir en una institución (hospital, prisión, etc.), haberse mudado o no vivir normalmente en la dirección proporcionada por la base de datos de usuarios del SAS, y datos erróneos de dicha base de datos (por ejemplo, dirección incompleta). Los participantes excluidos se reemplazaron con otros individuos de igual edad, sexo y localización.

CARACTERIZACIÓN DE LA DM

Se utilizó la Entrevista Mini-Internacional Neuropsiquiátrica (MINI) [14] para determinar los diagnósticos psiquiátricos en nuestra muestra, según criterios DSM-IV. Las entrevistas fueron realizadas por psicólogos entrenados y tuvieron lugar en el centro de atención primaria del participante o en su casa.

La sección de la entrevista psiquiátrica estaba compuesta por la entrevista MINI, que genera diagnósticos DSM-IV y CIDI-10 del eje I para 16 trastornos mentales. Esta entrevista consiste en una o dos preguntas de *screening* que se hacen a todos los participantes al comienzo de cada sección diagnóstica. A todos los que respondían de forma positiva a estas preguntas, se les hacían todas las preguntas de la sección que guiaban a la constatación del diagnóstico específico de la misma. La prevalencia de DM se calculó usando la información de la entrevista MINI, donde los diagnósticos de los trastornos mentales fueron determinados por sus respuestas sobre los síntomas. En este estudio se utilizó como variable dependiente un diagnóstico DSM-IV compatible con DM, generado por la entrevista MINI.

ANÁLISIS GENÉTICOS

- **Selección de SNPs.** Se seleccionaron 91 SNPs para su análisis en este estudio. Estos SNPs fueron elegidos entre los SNPs más replicados en estudios previos de asociación genética en depresión y entre aquellos descritos como sugerentes o claramente asociados a depresión en estudios previos de GWAS publicados entre los años 2010 y 2011. Escaneamos las bases de datos públicas para obtener información general sobre los genes y las variantes polimórficas de interés, incluyendo algún etiquetado de haplotipos y SNPs potencialmente funcionales, así como marcadores con frecuencia alélica menor del 10% ($MAF > 0.1$). Esta información fue entonces combinada y comparada con la lista de SNPs disponible en Illumina, Inc. (San Diego, CA, USA).
- **Genotipado.** Para la obtención de la muestra biológica de cada participante se utilizó el kit de recolección de ADN a partir de saliva de Oragene (OG-500; DNA Genotek Inc, Ottawa, ON, Canada). La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando procedimientos estándar. La concentración de ADN se midió por absorbancia usando el Infinite® M200 PRO *multimode reader* (Tecan US Inc, Research Triangle Park, NC, USA).

El genotipado se realizó con el sistema de genotipado TaqMan® OpenArray™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos en crudo obtenidos de este sistema fueron analizados con el *software* TaqMan Genotyper v1.2 (Thermo Fisher Scientific).

Se aplicaron criterios estrictos de control de calidad tanto para los SNPs como para los datos de los individuos. Se excluyeron los SNPs que presentaban una tasa de genotipos perdidos mayor del 1% o mostraron desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.01$). Los individuos con una tasa de datos genotípicos perdidos mayor del 10% o aquellos con ascendencia no europea también fueron excluidos.

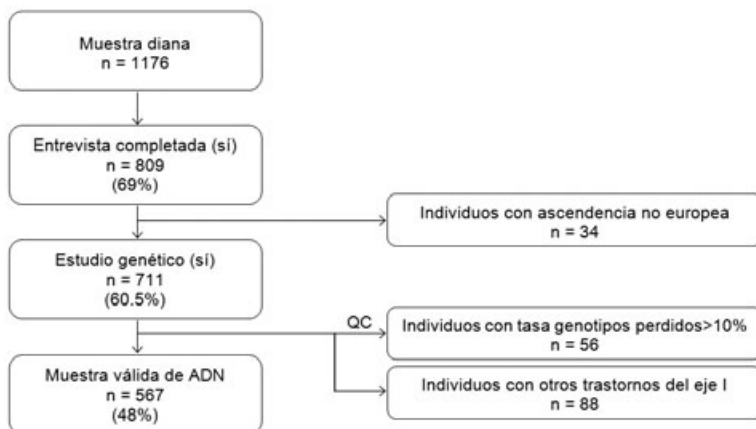
Tras los procedimientos de control de calidad, 85 SNPs y 567 individuos fueron incluidos en los análisis estadísticos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg en la totalidad de la muestra, y en casos y controles por separado, usando el programa Plink (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) [15]. El mismo programa estadístico fue también usado para analizar la asociación entre DM y los datos de los SNPs asumiendo un modelo genético aditivo.

Para corregir por comparaciones múltiples se utilizó el método *single nucleotide polymorphism spectral decomposition* (SNPSpD), que corrige por la no independencia de los SNPs en desequilibrio de ligamiento [16]. Según este método, el número efectivo de *loci* de marcadores independientes (MeffLi) era 61, y el umbral de significación del experimento requerido para mantener el error de tipo I al 5% era de $P < 0.01$.

FIGURA 1. Muestra del estudio GranadΣp y tasas de respuesta



Además, se estimaron frecuencias haplotípicas usando el algoritmo E-M estándar y se realizaron tests simples de asociación basados en la distribución de un conjunto probabilísticamente inferido de haplotipos en individuos con DM y controles. Se calcularon las ORs e intervalos de confianza del 95% (IC) específicos de cada haplotipo. Para los análisis de asociación de los haplotipos el nivel de significación estadística se estableció en $P < 0.05$.

El poder estadístico se calculó usando el *software* QUANTO v.1.2.4 (<http://bios-tats.usc.edu/Quanto.html>). De acuerdo con tales cálculos, necesitábamos al menos 67 casos y 505 controles para detectar un efecto genético en un rango de 2 y 5 con un poder entre el 50% y el 80% (IC de $P < 0.01$) si asumíamos un modelo genético aditivo, un riesgo de depresión del 0.15 y una frecuencia de los alelos de alto riesgo que oscilara desde 0.10 a 0.50. El poder de nuestra muestra aumentaba hasta el 80% si considerábamos un IC convencional de $P < 0.05$ y manteníamos el resto de ajustes como se describen arriba (tamaño del efecto esperado entre 2 y 5, prevalencia de depresión fijada al 15% y frecuencias alélicas entre 0.10 y 0.50).

Resultados

LA MUESTRA

De los 1,176 sujetos de la población general que fueron contactados e invitados a participar en esta fase del estudio, 711 participantes (305 hombres y 406 mujeres; edad media $\pm$ d.s.: 49.7 ± 16.7) proporcionaron consentimiento informado escrito y donaron una muestra biológica. La muestra final del estudio constaba de 567 in-

dividuos (Figura 1), 67 (11.8%) participantes que cumplían criterios para diagnóstico de DM (25 hombres, 42 mujeres; edad media $\pm$ d.s.: 51.25 $\pm$ 14.64) y 500 controles (230 hombres, 270 mujeres; edad media $\pm$ d.s.: 49.34 $\pm$ 16.05). En el grupo control no había diagnóstico de ningún trastorno psiquiátrico DSM-IV del eje I. Las características socio-demográficas y clínicas de la muestra se resumen en la Tabla 1. En resumen, aproximadamente la mitad eran mujeres, la edad media estaba en torno a los 50 años, más de la mitad de los participantes vivía en áreas urbanas, la mayoría tenían estudios al menos hasta nivel secundario, se encontraban en algún tipo de relación estable y estaban desempleados (Tabla 1).

TABLA 1. Características Socio-demográficas y Clínicas de la muestra GranadΣp.

Variable	Frecuencia
<i>Sexo (hombre/mujer)</i>	255 (45%) / 312 (55%)
<i>Edad media</i>	49.6 years (SD 16.8)
<i>Lugar de residencia</i>	
Urbano	348 (61.4%)
Intermedio	162 (28.5%)
Rural	57 (10.1%)
<i>Educación</i>	
Analfabeto	102 (18%)
Primaria	215 (37.9%)
Secundaria o superior	250 (44.1%)
<i>Estatus civil</i>	
Soltero	84 (14.8%)
Casado/pareja	420 (74.1%)
Viudo	35 (6.2%)
Divorciado/separado	28 (4.9%)
<i>Situación laboral</i>	
Empleado	225 (39.7%)
Desempleado	115 (20.3%)
Jubilado	99 (17.4%)
Incapacitado para trabajar	17 (3%)
Cuidado de la familia u hogar	80 (14.1%)
Estudiante a tiempo completo	31 (5.5%)
<i>Depresión mayor (N=567)</i>	
Casos	67 (11.8%)
Controles	500 (88.2%)

Los participantes que accedieron a formar parte en el estudio genético no se diferenciaban significativamente, en términos de sexo (género femenino 57.1 vs 54.7%, $\chi^2=0.14$, $P=0.71$), edad media (49.72 vs 52.09 años, t de Student=0.57, $P=0.45$), lugar de residencia ($\chi^2=3.87$, $P=0.14$), educación ($\chi^2=7.64$, $P=0.27$), estatus civil ($\chi^2=2.33$, $P=0.68$), situación laboral ($\chi^2=4.10$, $P=0.54$) o prevalencia de

DM (10.5 vs 9.4%, $\chi^2=0.09$, $P=0.77$), de aquellos que se negaron a dar una muestra biológica.

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA

Tras los análisis de regresión logística entre los 85 polimorfismos y DM, ninguno de los SNPs se asoció de forma estadísticamente significativa con DM después de la corrección por múltiples comparaciones ($P>0.01$ en todas las comparaciones). Sin embargo, 7 SNPs (s623580, rs9526236, rs17689966, rs173365, rs7209436, rs110402, rs242924) situados en el gen de la triptófano hidroxilasa 1 (*TPH1*; cromosoma 11), una variante intergénica situada aguas arriba del gen del receptor 2A de la 5-hidroxitriptamina (serotonina) (*HTR2A*; cromosoma 13) y el gen del receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina (*CRHR1*; cromosoma 17) mostraron una tendencia hacia la asociación, alcanzando niveles convencionales de significación estadística ($P<0.05$).

Los resultados de asociación con DM para los 7 top SNPs se muestran en la Tabla 2. La Figura 2 y la Tabla Suplementaria 1 muestran los resultados de asociación de los 85 SNPs incluidos en los análisis.

TABLA 2. Análisis de asociación entre los 7 top SNPs y DM en el estudio GranadΣp.

SNP	Gen	Chr	Posición (GRCh38)	Alelo ^a	MAF ^b	DM		
						OR	SE	P-valor
rs623580	<i>TPH1</i>	11	18042430	<u>A</u> /I	0.37 (A)	0.614	0.219	0.026
rs9526236	Variante intergénica	13	46814392	<u>C</u> /T	0.42 (T)	0.657	0.189	0.027
rs17689966	<i>CRHR1</i>	17	45833089	<u>C</u> /A	0.39 (G)	1.524	0.190	0.026
rs173365	<i>CRHR1</i>	17	45823708	<u>A</u> /G	0.37 (A)	1.526	0.192	0.027
rs7209436	<i>CRHR1</i>	17	45792776	<u>C</u> /T	0.47 (C)	1.540	0.188	0.022
rs110402	<i>CRHR1</i>	17	45802681	<u>C</u> /A	0.46 (G)	1.487	0.190	0.036
rs242924	<i>CRHR1</i>	17	45808001	<u>C</u> /T	0.46 (G)	1.502	0.191	0.033

Notas: a) Los alelos de riesgo están subrayados. b) El alelo menor están entre paréntesis. Abreviaturas: SNP, polimorfismo de nucleótido único; Chr, cromosoma; MAF, frecuencia del alelo menor; DM, depresión mayor; OR, *odds ratio*; SE, error estándar.

TABLA 1S. Análisis de asociación entre los 85 SNPs y DM en el estudio GranadΣp.

Chr	Gen	SNP	Descripción	DM		
				OR	SE	P-valor
1	RPL31P12	rs2568958	Ribosomal protein L31 pseudogene 12	0.746	0.208	0.157
	-	rs2815752	Intergenic variant	0.840	0.208	0.401
	TNNI3K / FPGT-TNNI3K	rs1514175	TNNI3 interacting kinase / FPGT-TNNI3K readthrough	1.113	0.188	0.568
	SEC16B	rs543874	SEC16 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	1.344	0.269	0.272
2	-	rs713586	Intergenic variant	0.943	0.185	0.752
3	TRIM71	rs1878887	Tripartite motif containing 71, E3 ubiquitin protein ligase	1.339	0.234	0.212
	DGKG	rs9816226	Diacylglycerol kinase, gamma 90kDa	0.821	0.258	0.446
4	-	rs10938397	Intergenic variant	0.802	0.190	0.246
5	RP11-158J3.2 / HTR1A	rs6295	Gene RP11-158J3.2 / 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A, G protein-coupled	0.851	0.191	0.395
6	FKBP5	rs992105	FK506 binding protein 5	0.829	0.259	0.468
		rs1360780		0.821	0.205	0.337
	FKBP5 / RP3-340B19.5	rs737054	FK506 binding protein 5 / Gene RP3-340B19.5	1.258	0.209	0.273
		rs3777747		1.326	0.188	0.134
	KHDC1 / RP11-257K9.8	rs2350753	KH homology domain containing 1 / Uncharacterized protein	0.980	0.310	0.948
	-	rs4235835	Intergenic variant	1.347	0.193	0.123
7	CRHR2	rs3779250	Corticotropinreleasing hormone receptor 2	0.952	0.188	0.795
		rs2267710		1.102	0.192	0.613
		rs1076292		1.083	0.188	0.673
		rs2284217		1.290	0.221	0.248
9	-	rs7866605	Intergenic variant	3.028	0.847	0.191
	NTRK2	rs1211166	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	0.946	0.244	0.819

TABLA 1S (cont.). Análisis de asociación entre los 85 SNPs y DM en el estudio GranadΣp.

Chr	Gen	SNP	Descripción	DM		
				OR	SE	P-valor
11	TPH1	rs10488683	Tryptophanhydroxylase 1	0.882	0.184	0.494
		rs211107		1.262	0.184	0.206
		rs623580		0.614	0.219	0.026
		rs652458		1.250	0.185	0.228
	-	rs7110238	Intergenic variant	0.877	0.189	0.486
	-	rs11024460	Intergenic variant	0.945	0.209	0.786
	SAAL1	rs951624	Serumamyloid A-like 1	1.455	0.327	0.252
	BDNF / BDNF-AS	rs6265	Brain-derived neurotrophic factor/ BDNF antisense RNA	0.955	0.240	0.847
	RP11- 587D21. 4 / BDNF	rs10767664	Gene RP11-587D21. 4 / Brain- derived neurotrophic factor	0.900	0.226	0.640
	MTCH2	rs3817334	Mitochondrialcarrier 2	0.839	0.209	0.401
12	TBC1D15	rs3759171	TBC1 domainfamily, member 15	1.003	0.203	0.989
		rs10506643		0.843	0.330	0.604
	TPH2	rs2129575	Tryptophanhydroxylase 2	0.948	0.246	0.829
		rs1386493		1.102	0.241	0.687
		rs6582078		0.940	0.188	0.741
		rs1386497		0.846	0.273	0.540
		rs1487278		0.979	0.238	0.930
		rs1386482		1.299	0.198	0.187
		rs1872824		0.988	0.196	0.952
	-	rs9526236	Intergenic variant	0.657	0.189	0.027
13	HTR2A	rs3125	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A, G protein-coupled	1.056	0.239	0.820
		rs6314		0.871	0.344	0.688
		rs977003		1.366	0.183	0.088
		rs9567735		1.221	0.243	0.411
		rs582385		1.276	0.233	0.296
		rs731779		0.595	0.280	0.064
		rs9534505		0.722	0.376	0.386
		rs2070037		0.743	0.244	0.222

TABLA 1S (cont.). Análisis de asociación entre los 85 SNPs y DM en el estudio GranadΣp.

Chr	Gen	SNP	Descripción	DM		
				OR	SE	P-valor
		rs6311		0.944	0.183	0.754
		rs1328685		0.902	0.288	0.720
	HTR2A / HTR2A-AS1	rs7330636	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A, G protein-coupled / HTR2A antisense RNA 1	1.257	0.193	0.236
		rs2296972		0.899	0.223	0.634
		rs659734		1.365	0.344	0.366
-		rs2149434	Regulatory region variant	1.013	0.196	0.946
-		rs943903	Intergenic variant	1.014	0.196	0.944
15	MAP2K5	rs2241423	Mitogen-activated protein kinase kinase 5	1.117	0.211	0.601
16	-	rs12444979	Intergenic variant	0.957	0.281	0.877
	SH2B1	rs7498665	SH2B adaptorprotein 1	0.968	0.199	0.872
	ATP2A1 / SH2B1	rs7359397	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1 / SH2B adaptor protein 1	0.916	0.201	0.661
17	CRHR1 / RP11- 105N13	rs12953076	Corticotropin releasing hormone receptor 1 / Gene RP11-105N13	0.942	0.229	0.794
		rs4076452		0.944	0.230	0.801
		rs12942300		0.653	0.322	0.186
		rs7209436		1.540	0.188	0.022
		rs4792887		0.944	0.284	0.838
		rs110402		1.487	0.190	0.036
		rs242924		1.502	0.191	0.033
		rs242939		0.691	0.372	0.320
	CRHR1	rs173365	Corticotropin releasing hormone receptor 1	1.526	0.192	0.027
		rs1396862		0.895	0.212	0.601
		rs1876831		0.911	0.186	0.616
		rs17689966		1.524	0.190	0.026
		rs1876828		1.034	0.201	0.866
18	-	rs17782313	Intergenic variant	1.207	0.220	0.392

TABLA 1S (cont.). Análisis de asociación entre los 85 SNPs y DM en el estudio GranadΣp.

Chr	Gen	SNP	Descripción	DM		
				OR	SE	P-valor
19	QPCTL	rs2287019	Glutaminyl-peptide cyclotransferase-like	0.952	0.242	0.840
22	COMT / MIR4761	rs4680	Catechol-O-methyltransferase / MicroRNA 4761	1.040	0.195	0.839
X	HTR2C	rs508865	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C, G protein-coupled	1.333	0.217	0.184
		rs505971		1.336	0.217	0.182
		rs12858300		1.484	0.396	0.319
		rs12688102		1.210	0.219	0.384
		rs12833104		0.873	0.305	0.655
		rs6318		1.468	0.260	0.140
		rs2428712		1.445	0.266	0.167
		rs5946018		1.477	0.263	0.137
		rs1801412		1.650	0.400	0.211

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de nucleótido único; Chr, cromosoma; DM, depresión mayor; OR, odds ratio; SE, error estándar.

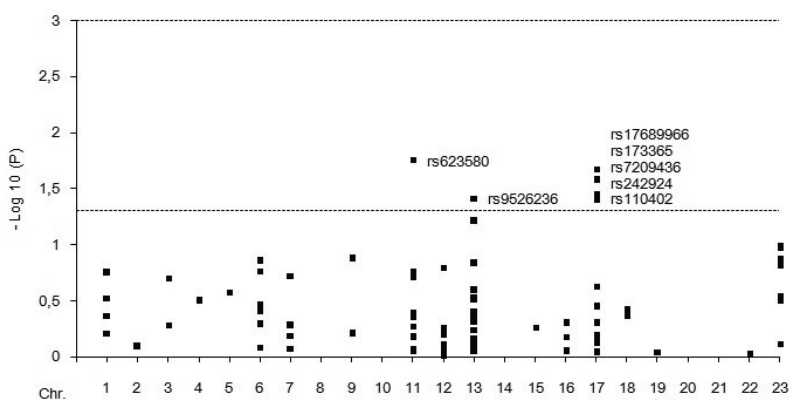


FIGURA 2. Manhattan plot de la asociación entre los 85 SNPs y DM.

Las líneas de puntos representan los umbrales con p-valor 0.05 y 0.01.

ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS EN EL GEN *CRHR1*

Los 5 marcadores del gen *CRHR1* sugerentes de estar asociados a DM en nuestra muestra fueron incluidos en un análisis haplotípico. La Tabla 3 muestra las frecuencias haplotípicas estimadas en casos con DM y controles. Observamos tres haplotipos principales que representan el 98% de todas las combinaciones posibles de marcadores en los casos y el 96% en los controles. La distribución de haplotipos difería significativamente entre ambos grupos ($\chi^2=8.70$, $gl=3$, $P=0.034$). En concreto, encontramos que el haplotipo TATGA (rs7209436–rs110402–rs242924–rs173365–rs17689966) era significativamente más frecuente en casos (42%) que en controles (30%) (OR=1.68; IC 95%: 1.16–2.43; $P=0.005$) (Tabla 3).

También se llevó a cabo un análisis haplotípico incluyendo solo 3 de los 5 marcadores del gen *CRHR1*. Esos 3 SNPs (rs7209436–rs110402–rs242924) constituyen el conocido haplotipo TAT del *CRHR1* que previamente se ha descrito asociado a depresión en otros estudios (Tabla 3). En este caso, fueron dos los haplotipos principales que representaban el 99% de todas las combinaciones posibles tanto en casos como en controles. El haplotipo TAT era significativamente más frecuente en casos (44%) que en controles (34%) (OR=1.53; IC 95%: 1.06–2.20; $P=0.023$), mientras que el haplotipo CGG era significativamente más frecuente en controles (65%) que en casos (44%) (OR=0.66; 95% CI: 0.46–0.96; $P=0.028$).

TABLA 3. Frecuencias haplotípicas estimadas del gen *CRHR1* en casos y controles

Haplotipo ^a	Frecuencia (Casos)	Frecuencia (Controles)	χ^2	P-valor	OR (95% IC, P-valor) ^b
TATGA	0.42	0.30	7.92	0.005	1.68 (1.16–2.42, 0.006)
CGGGA	0.15	0.16	0.14	0.705	
TATAG	0.02	0.04	1.48	0.224	
CGGAG	0.41	0.50	3.38	0.066	
TAT	0.44	0.34	5.18	0.023	1.53 (1.06–2.20, 0.023)
CAT	0.01	0.01	0.32	0.573	
CGG	0.55	0.65	4.53	0.033	0.66 (0.46–0.96, 0.028)

Notas: ^aSNPs que forman los haplotipos son 1) rs7209436–rs110402–rs242924–rs173365–rs17689966, y 2) rs7209436–rs110402–rs242924; ^bRiesgo (95% IC y P-valor) conferido por los haplotipos TATGA, TAT CGG en comparación con cualquier otra combinación de haplotipo.

Abreviaturas: OR, *odds ratio*; 95% IC, 95% intervalo de confianza.

Discusión

El objetivo principal de este estudio era investigar las asociaciones entre 91 SNPs candidatos para DM en una muestra de la población general adulta de Andalucía. Aunque ninguna de las asociaciones analizadas fue estadísticamente significativa después de la corrección por múltiples comparaciones ($P > 0.01$), siete SNPs (rs623580, rs9526236, rs17689966, rs173365, rs7209436, rs110402, rs242924) localizados en el gen *TPH1*, *HTR2A* y *CRHR1* mostraron una tendencia hacia la asociación ($P < 0.05$) con DM.

TPH1 y *HTR2A* son genes clave en la neurotransmisión serotoninérgica, y perturbaciones en el sistema de la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) constituyen la anomalía neurobiológica más extensamente estudiada y sólidamente asociada con DM [17, 18]. El neurotransmisor serotonina modula varias funciones relacionadas con la homeostasis y respuestas al ambiente, que a su vez están ligadas a DM. Además, la mayoría de los antidepresivos tienen influencia directa o indirecta en la actividad serotoninérgica [19, 20].

El *CRHR1* es un gen clave en el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) que clásicamente ha sido implicado en la etiología de la DM [19]. El eje HHA juega un importante papel en la adaptación humana a factores estresantes ambientales, y su disfunción es uno de los hallazgos más robustos en personas con DM [20-23].

ASOCIACIÓN ENTRE EL GEN *TPH1* Y DM

El gen *TPH1* codifica una isoforma de la triptófano hidroxilasa (TPH), una enzima limitante en la biosíntesis del neurotransmisor serotonina [24, 25]. El rs623580 (3804T/A) es una variante genética situada aguas arriba en una región reguladora dentro de la secuencia 5'-UTR del gen *TPH1* en el cromosoma 11 [26].

Estudios previos que implican a este polimorfismo han reportado resultados negativos de asociación con trastornos afectivos [26, 27] y comportamientos relacionados con el suicidio (28). Sin embargo, Kwak et al (2012), en un GWAS de 8,842 individuos, encontraron que este polimorfismo estaba asociado con el índice de masa corporal (IMC), una medida de obesidad que ha sido relacionada en numerosas ocasiones con DM [29-33].

ASOCIACIÓN ENTRE EL GEN *HTR2A* Y DM

El gen *HTR2A* es particularmente interesante en el campo de la psiquiatría biológica por su papel como una importante diana para las drogas psicotrópicas y por mostrar una expresión alterada en muchos trastornos neuropsiquiátricos como DM y esquizofrenia [34-36]. El gen *HTR2A*, en el cromosoma 13, está implicado en la regulación de la neurotransmisión serotoninérgica [37] y en el eje HHA [38, 39]. El gen

HTR2A ha sido extensamente investigado en estudios de asociación de muchas condiciones psiquiátricas, pero los resultados no son concluyentes y no nos permiten extraer conclusiones definitivas sobre la potencial implicación de este gen en DM [40].

En el presente estudio, el polimorfismo rs9526236 (*HTR2A*) mostró una tendencia a la asociación con DM. Aunque este polimorfismo no ha sido investigado en estudios previos, su localización aguas arriba de la región promotora del gen *HTR2A* y su funcionalidad lo hacen un buen candidato para ser investigado más en profundidad en futuros estudios.

ASOCIACIÓN ENTRE EL GEN *CRHR1* Y DM

En nuestro estudio, los resultados más sugerentes se obtuvieron con el gen *CRHR1*, situado en el cromosoma 17. El gen *CRHR1* media respuestas a estrés y estimulación del eje HHA uniéndose su producto principalmente a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) [20].

Nuestros resultados revelan que cinco SNPs (rs7209436, rs110402, rs242924, rs173365 y rs17689966) dentro de este gen muestran una tendencia hacia la asociación ($P < 0.05$) con DM.

En 2006, Liu et al fueron los primeros en implicar este gen en la susceptibilidad a DM. Encontraron que un SNP (rs242939) y un haplotipo de 3 SNPs (rs1876828–rs242939–rs242924) aparecían sobrerrepresentados en pacientes con DM en comparación con los controles [41]. Asimismo, Ishitobi et al encontraron una asociación significativa entre dos SNPs (rs110402 y de nuevo el rs242924) y un haplotipo de 5 SNPs (rs7209436–rs110402–rs242924–rs242940–rs173365) con DM [42].

En nuestro estudio, encontramos una tendencia hacia la asociación entre cinco SNPs (rs17689966, rs173365, rs7209436, rs110402, rs242924) dentro del gen *CRHR1* y DM, lo que apoya los resultados de estudios previos [41, 42].

Dado que con una aproximación de único marcador la variable analizada podría no estar en asociación con ningún SNP, pero sí podría asociarse con un haplotipo específico, decidimos aplicar una aproximación haplotípica.

Realizamos análisis haplotípicos con los 5 top SNPs del gen *CRHR1* asociados en nuestro estudio, y además con los 3 SNPs que constituyen el conocido haplotipo TAT del *CRHR1*. Nuestros resultados mostraron que tanto el haplotipo TATGA (rs7209436–rs110402–rs242924–rs173365–rs17689966) como el TAT (rs7209436–rs110402–rs242924), estaban significativamente asociados con DM.

Últimamente, diversos estudios se han centrado en cómo el haplotipo TAT modera el efecto del abuso en la infancia sobre el riesgo para DM [43-46]. Se ha visto un efecto protector en estudios que incluyen individuos afro-americanos [43, 44]. Polanczyk et al (2009) replicaron una asociación positiva para la cohorte E-risk, pero una negativa para la cohorte Dunedin, muy probablemente debido a los diferentes instrumentos utilizados para la evaluación de los acontecimientos vitales estresantes (AVEs) en la infancia [46].

FORTALEZAS Y LIMITACIONES

Nuestro estudio se basó en una aproximación por genes candidatos. Esto es muy ventajoso ya que los estudios de genes candidatos: i) son relativamente baratos y rápidos de realizar, ii) se basan en el conocimiento previo sobre los genes y mecanismos de la enfermedad, y iii) necesitan un número relativamente bajo de tests en comparación con los GWAS, de modo que el umbral de significación puede ser menos estricto [47]. Además, los participantes incluidos en este estudio se obtuvieron de la población general y fueron muy bien caracterizados para variables clínicas, psicológicas, socio-demográficas, de estilo de vida, estrés psicosocial y otros aspectos ambientales.

La principal limitación de nuestro estudio es su tamaño muestral, que, como muestra el cálculo de poder realizado en la sección de análisis estadísticos, tiene un poder limitado para detectar efectos pequeños e incluso moderados. Asimismo, se ha investigado un número reducido de SNPs candidatos. Aunque priorizamos la replicación de asociaciones previas entre genes clave y DM, otros genes procedentes de rutas metabólicas teóricamente relevantes (genes ya conocidos o genes novel identificados en GWAS recientes) pueden no haber sido incluidos en los análisis.

Conclusión

En conclusión, nuestros resultados parecen apoyar la implicación del eje HHA y el sistema de neurotransmisión serotoninérgica en la susceptibilidad genética para DM.

Para la validación y replicación de los presentes hallazgos se necesitarán estudios futuros que incluyan un mayor tamaño muestral.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado fundamentalmente por una beca del Consejo Andaluz de Sistema Sanitario Andaluz (PI0322/2009) y parcialmente por Astra-Zeneca en convenio con CIBERSAM. También ha sido financiado gracias a una beca predoctoral FPU del Ministerio de Educación del Gobierno de España (AP2010-3563) y una beca concedida por la Consejería de Innovación de la Junta de Andalucía (CTS-6682).

Referencias

1. Demyttenaere K, Bruffaerts R, Posada-Villa J, Gasquet I, Kovess V, Lepine JP, et al. Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *Jama*. 2004; 291(21):2581-90.
2. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Jama*. 2003; 289(23):3095-105.

3. WHO WHO. World Health Organization: The Global Burden of Disease: 2004 Update. WHO Press. 2008:146.
4. Prince M, Patel V, Saxena S, Maj M, Maselko J, Phillips MR, et al. No health without mental health. *Lancet*. 2007; 370(9590):859-77.
5. Kendler KS, Gatz M, Gardner CO, Pedersen NL. Personality and major depression: a Swedish longitudinal, population-based twin study. *Archives of general psychiatry*. 2006; 63(10):1113-20.
6. Kendler KS, Gatz M, Gardner CO, Pedersen NL. A Swedish national twin study of life-time major depression. *The American journal of psychiatry*. 2006; 163(1):109-14.
7. Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *The American journal of psychiatry*. 2000; 157(10):1552-62.
8. Collins PY, Patel V, Joestl SS, March D, Insel TR, Daar AS, et al. Grand challenges in global mental health. *Nature*. 2011; 475(7354):27-30.
9. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science (New York, NY)*. 1996; 273(5281):1516-7.
10. Burmeister M, McInnis MG, Zollner S. Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nature reviews Genetics*. 2008; 9(7):527-40.
11. Flint J, Kendler KS. The genetics of major depression. *Neuron*. 2014; 81(3):484-503.
12. Cervilla J, Ruiz I, Rodríguez-Barranco M, McKenney K, Rivera M, Molina E. Study protocol and methods in the Andalusian epidemiological mental health study (PISMA-ep study). *Revista de Psiquiatría y Salud Mental*. 2015 (submitted).
13. Ocaña-Riola R, Sánchez-Cantalejo C. Rurality Index for Small Areas in Spain. *Soc Indic Res*. 2005;73(2):247-66.
14. Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, et al. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *The Journal of clinical psychiatry*. 1998; 59 Suppl 20:22-33;quiz 4-57.
15. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M A R, Bender D, et al. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *American Journal of Human Genetics*. 2007; 81(3):559-75.
16. Nyholt DR. A Simple Correction for Multiple Testing for Single-Nucleotide Polymorphisms in Linkage Disequilibrium with Each Other. *American Journal of Human Genetics*. 2004; 74(4):765-9.
17. Pariante CM, Lightman SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*. 2008; 31(9):464-8.
18. Lopez JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ. A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biological psychiatry*. 1998; 43(8):547-73.
19. Gatt JM, Burton KL, Williams LM, Schofield PR. Specific and common genes implicated across major mental disorders: a review of meta-analysis studies. *Journal of psychiatric research*. 2015; 60:1-13.

20. Schatzberg AF, Keller J, Tennakoon L, Lembke A, Williams G, Kraemer FB, et al. HPA axis genetic variation, cortisol and psychosis in major depression. *Mol Psychiatry*. 2014; 19(2):220-7.
21. Nemeroff CB, Vale WW. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. *The Journal of clinical psychiatry*. 2005; 66 Suppl 7:5-13.
22. Leonard BE, Myint A. The psychoneuroimmunology of depression. *Human psychopharmacology*. 2009; 24(3):165-75.
23. Holsboer F. The stress hormone system is back on the map. *Current psychiatry reports*. 2000; 2(6):454-6.
24. Kato M, Serretti A. Review and meta-analysis of antidepressant pharmacogenetic findings in major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 2010; 15(5):473-500.
25. Andre K, Kampman O, Viikki M, Illi A, Setälä-Soikkeli E, Poutanen O, et al. TPH1 A218C polymorphism and temperament in major depression. *BMC psychiatry*. 2013; 13:118.
26. Lai TJ, Wu CY, Tsai HW, Lin YM, Sun HS. Polymorphism screening and haplotype analysis of the tryptophan hydroxylase gene (TPH1) and association with bipolar affective disorder in Taiwan. *BMC medical genetics*. 2005; 6:14.
27. Shi J, Badner JA, Hattori E, Potash JB, Willour VL, McMahon FJ, et al. Neurotransmission and bipolar disorder: a systematic family-based association study. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2008; 147b(7):1270-7.
28. Brent D, Melhem N, Ferrell R, Emslie G, Wagner KD, Ryan N, et al. Association of FKBP5 polymorphisms with suicidal events in the Treatment of Resistant Depression in Adolescents (TORDIA) study. *The American journal of psychiatry*. 2010; 167(2):190-7.
29. Kwak SH, Park BL, Kim H, German MS, Go MJ, Jung HS, et al. Association of variations in TPH1 and HTR2B with gestational weight gain and measures of obesity. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2012; 20(1):233-8.
30. Opel N, Redlich R, Grotegerd D, Dohm K, Heindel W, Kugel H, et al. Obesity and major depression: Body-mass index (BMI) is associated with a severe course of disease and specific neurostructural alterations. *Psychoneuroendocrinology*. 2015; 51:219-26.
31. Luppino FS, de Wit LM, Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, Penninx BW, et al. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Archives of general psychiatry*. 2010; 67(3):220-9.
32. Hung CF, Rivera M, Craddock N, Owen MJ, Gill M, Korszun A, et al. Relationship between obesity and the risk of clinically significant depression: Mendelian randomisation study. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 2014; 205(1):24-8.
33. de Wit L, Luppino F, van Straten A, Penninx B, Zitman F, Cuijpers P. Depression and obesity: a meta-analysis of community-based studies. *Psychiatry research*. 2010; 178(2):230-5.
34. 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(6):574-91.

35. Norton N, Owen MJ. HTR2A: association and expression studies in neuropsychiatric genetics. *Annals of medicine*. 2005; 37(2):121-9.
36. 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. *Mol Psychiatry*. 2004; 9(1):109-14.
37. Falkenberg VR, Gurbaxani BM, Unger ER, Rajeevan MS. Functional genomics of serotonin receptor 2A (HTR2A): interaction of polymorphism, methylation, expression and disease association. *Neuromolecular medicine*. 2011; 13(1):66-76.
38. Lanfumey L, Mongeau R, Cohen-Salmon C, Hamon M. Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2008; 32(6):1174-84.
39. Porter RJ, Gallagher P, Watson S, Young AH. Corticosteroid-serotonin interactions in depression: a review of the human evidence. *Psychopharmacology*. 2004;173(1-2):1-17.
40. Zhao X, Sun L, Sun YH, Ren C, Chen J, Wu ZQ, et al. Association of HTR2A T102C and A-1438G polymorphisms with susceptibility to major depressive disorder: a meta-analysis. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2014; 35(12):1857-66.
41. Liu Z, Zhu F, Wang G, Xiao Z, Tang J, Liu W, et al. Association study of corticotropin-releasing hormone receptor1 gene polymorphisms and antidepressant response in major depressive disorders. *Neuroscience Letters*. 2007; 414(2):155-8.
42. Ishitobi Y, Nakayama S, Yamaguchi K, Kanehisa M, Higuma H, Maruyama Y, et al. Association of CRHR1 and CRHR2 with major depressive disorder and panic disorder in a Japanese population. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2012; 159b(4):429-36.
43. Bradley RG, Binder EB, Epstein MP, Tang Y, Nair HP, Liu W, et al. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Archives of general psychiatry*. 2008; 65(2):190-200.
44. Kranzler HR, Feinn R, Nelson EC, Covault J, Anton RF, Farrer L, et al. A CRHR1 haplotype moderates the effect of adverse childhood experiences on lifetime risk of major depressive episode in African-American women. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2011; 156b(8):960-8.
45. Nugent NR, Tyrka AR, Carpenter LL, Price LH. Gene-environment interactions: early life stress and risk for depressive and anxiety disorders. *Psychopharmacology*. 2011; 214(1):175-96.
46. Polanczyk G, Caspi A, Williams B, Price TS, Danese A, Sugden K, et al. Protective effect of CRHR1 gene variants on the development of adult depression following childhood maltreatment: replication and extension. *Archives of general psychiatry*. 2009; 66(9):978-85.
47. Patnala R, Clements J, Batra J. Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. *BMC genetics*. 2013; 14:39.

Factores asociados a la ideación suicida en pacientes con fibromialgia

Lafuente C, Pita-Calandre E,
Salgueiro M, García-Leiva JM

Resumen

Las conductas suicidas son frecuentes en fibromialgia. Para prevenirlas es necesario conocer los componentes que intervienen en ellas. El objetivo de este estudio es evaluar diversos factores susceptibles de influir en los comportamientos suicidas. Se realizó un estudio transversal en el que participaron pacientes con fibromialgia y sujetos sanos. Los instrumentos utilizados fueron: el Cuestionario de Salud del Paciente (PHQ-9), el Índice de Severidad del Insomnio (ISI), el Cuestionario de Impacto de Fibromialgia Revisado (FIQR), el Cuestionario de Necesidades Interpersonales (INQ), la Escala de Riesgo Suicida de Plutchik (Plutchik) y la Escala de Ajuste Marital (LWMAT). El ítem 9 del cuestionario PHQ-9 midió la ideación suicida (IS).

Los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza, modelos de regresión logística binaria y análisis correlacionales. La muestra incluyó 49 controles y 53 pacientes con fibromialgia, de los que 15 presentaron ideación suicida (28,3%). Los factores relacionados con ésta fueron la intensidad de la depresión ($p<0,0001$), la sensación de ser una carga para los demás ($p=0,1375$) y un bajo grado de satisfacción marital ($p=0,0029$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con y sin ideación suicida respecto a la gravedad de la fibromialgia, la calidad del sueño y el sentimiento de no pertenencia a un grupo. Los factores que mayor influencia mostraron sobre la ideación suicida fueron la severidad de la depresión, la sensación de ser una carga y un ajuste marital defectuoso.

Palabras clave: *Fibromialgia, ideación suicida.*

Introducción

El suicidio, problema social que podría ser evitado en muchos casos, afecta a un porcentaje importante de la población. Un estudio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizado en 17 países mostró que la prevalencia de ideación sui-

cida y de intentos de suicidio era de 9,2 y 2,7% respectivamente [23]. Las cifras de este estudio relativas a España son de un 4,4% para la prevalencia de ideación suicida y de un 1,5% para los intentos de suicidio [14].

Se sabe que los factores de riesgo relacionados con el suicidio más prevalentes incluyen el sexo femenino, ser joven, carecer de pareja, tener un bajo nivel de estudios y padecer trastornos mentales [22]. También se consideran factores de riesgo el primer año de aparición de la ideación suicida [14] y los intentos previos de suicidio [4]. Las separaciones entre parejas son otro factor de riesgo importante, incrementándose tres veces la ideación suicida y ocho veces los planes e intentos de suicidio antes y después de la separación; siendo el tener pareja, un factor protector frente a la mortalidad por suicidio [3]. Entre las enfermedades mentales los trastornos afectivos, el trastorno de control de impulsos, el trastorno de ansiedad generalizada y el trastorno de estrés postraumático, son factores asociados a conductas suicidas [23,14].

Varios estudios, realizados en amplios grupos de población, han evaluado la relación entre las conductas suicidas y diferentes tipos de dolor crónico, encontrando todos ellos, tras controlar factores sociodemográficos y comorbilidad psiquiátrica, una clara asociación entre ambos [26, 6, 17, 16].

Los trastornos del sueño constituyen, asimismo, un factor de riesgo para conductas suicidas, independientemente de la presencia o no de depresión asociada [5]. Un metaanálisis reciente puso de manifiesto que tanto la ideación suicida (RR: 1,86, 95% IC 1,52-2,28, $p<0,001$) como los intentos de suicidio (RR: 2,01, 95% IC 1,47-2,74, $p<0,001$) y el suicidio consumado (RR: 1,96, 95% IC 1,32-2,91, $p<0,001$) mostraban una marcada asociación con los trastornos del sueño [24].

La fibromialgia es una enfermedad crónica que se caracteriza por dolor generalizado, fatiga, sueño no reparador, rigidez matutina, síntomas de ansiedad y depresión, problemas cognitivos e hipersensibilidad a estímulos físicos y psicológicos [35, 1]. Su prevalencia mundial es de un 2,7%, mientras que a nivel nacional es de un 2,4% [7, 25]; predomina en mujeres, población adulta (con un pico de incidencia a la edad de 45-65 años) y se asocia con un bajo nivel de estudios, un bajo nivel socioeconómico y con residir en zonas rurales [25].

Varios estudios corroboran que en los pacientes con fibromialgia son frecuentes los comportamientos de tipo suicida. Dreyer et al. 2010 [12] analizaron la mortalidad en una cohorte de pacientes daneses con fibromialgia, encontrando que el riesgo de muerte por suicidio, enfermedad hepática o cerebrovascular era mayor que en la población general. Wolfe et al. 2011 [33] encontraron en EEUU un resultado similar, observando que, mientras la mortalidad global no estaba aumentada en los pacientes con fibromialgia, el riesgo de muerte por suicidio o accidente sí lo estaba.

Un trabajo publicado en 2011 [10] evaluó la prevalencia de intentos previos de suicidio en estos pacientes, encontrando que el 16,7% de la muestra refirió entre uno y tres intentos previos de suicidio. Posteriormente, este mismo grupo publicó dos estudios relativos a la ideación suicida en fibromialgia. El

primero de ellos encontró que la prevalencia de ideación suicida en estos pacientes se asociaba nuevamente con la severidad de la enfermedad, siendo, sin embargo, la sintomatología psicológica más influyente que la física [9]. El segundo, en el que compararon pacientes con fibromialgia, pacientes con lumbalgia crónica y sujetos sanos, encontraron que la baja calidad del sueño, la ideación suicida y el riesgo de suicidio predominaban en el grupo con fibromialgia asociándose estos dos últimos factores con la intensidad de la sintomatología depresiva [19]. Un tercer estudio publicado por Triñanes et al. [31], en el que sólo evaluaron mujeres, encontró datos similares, destacando también la ansiedad y el impacto de la enfermedad en la vida cotidiana, como factores asociados a la ideación suicida.

Joiner en 2005 [20] propuso *La teoría interpersonal-psicológica de los comportamientos suicidas*, en la que expuso que el acto suicida puede desencadenarse por la presencia de tres variables. Estas son: el sentimiento de ser una carga para los demás, la sensación de no pertenecer a un grupo y la capacidad de suicidarse. Para medir los dos primeros factores, Van Orden et al. [32] desarrollaron un cuestionario específico, el *Cuestionario de Relaciones Interpersonales*, que ha sido aplicado en distintos grupos de población. Cukrowitz et al. [11] encontraron, tras administrarlo a personas mayores, que el sentimiento de ser una carga para los demás era el factor que más se asociaba a la presencia de ideación suicida tras controlar la sintomatología depresiva y las discapacidades funcionales. Este mismo instrumento fue utilizado por Bryan [8] en una muestra de personal militar, confirmando que el sentimiento de ser una carga y la sensación de no pertenecer a un grupo se correlacionaban con sintomatología psiquiátrica e incrementaban el riesgo de desarrollar comportamientos de tipo suicida. Kanzler et al. [21] evaluaron la sensación de ser una carga en pacientes con dolor crónico, señalando que esta podía predecir significativamente la presencia de ideación suicida.

A pesar de haberse comprobado la estrecha relación entre la ideación suicida con la sensación de ser una carga y el sentimiento de no pertenecer a un grupo, estos factores no han sido evaluados con anterioridad en pacientes con fibromialgia. Por otra parte, tampoco se ha estudiado en estos pacientes la posible influencia de las relaciones de pareja; sabiendo que el vivir solo o carecer de pareja son factores de riesgo para desarrollar conductas de tipo suicida, merecería la pena analizar si un buen ajuste marital es un factor protector ante este tipo de comportamientos.

Así pues, se desarrolló el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- *Objetivo primario:* Evaluar la asociación entre la ideación suicida y los siguientes factores psicosociales: la sensación de ser una carga, el sentimiento de no pertenecer a un grupo y la calidad de las relaciones de pareja.
- *Objetivos secundarios:* Estudiar la prevalencia de la ideación suicida y el riesgo de suicidio en una muestra de pacientes con fibromialgia y sujetos sanos

y evaluar la asociación entre la ideación suicida y factores propios de la enfermedad como son el dolor, la depresión y los trastornos del sueño.

Material y Métodos

DISEÑO

Se realizó un estudio transversal en el que participaron dos grupos: pacientes con fibromialgia y sujetos sanos.

La recogida de datos, se realizó en una única evaluación. Las variables del estudio se recogieron mediante diversos cuestionarios auto-administrados y cumplimentados de forma anónima, en los que se incluyeron también preguntas de tipo sociodemográfico (edad, sexo, nivel de estudios y actividad laboral). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Granada.

SUJETOS

Para participar en el estudio se siguió un criterio común de inclusión, que los sujetos fuesen mayores de edad, existiendo un criterio adicional para el grupo con fibromialgia, haber sido diagnosticado de la enfermedad según los criterios del Colegio Americano de Reumatología [34]. No se consideró criterio de exclusión para los pacientes la comorbilidad con otras patologías.

Los criterios de exclusión para el grupo control fueron: presentar patología dolorosa grave, padecer un trastorno mental y/o padecer una enfermedad orgánica severa.

La presencia de dificultades para entender los objetivos del estudio y contestar adecuadamente a los diversos cuestionarios se consideró criterio de exclusión para ambos grupos.

El reclutamiento del grupo de pacientes se llevó a cabo mediante el contacto con diversas asociaciones de afectados de diferentes provincias españolas, mientras que los controles que participaron fueron amigos y conocidos de los investigadores y/o de los pacientes.

INSTRUMENTOS PARA LA RECOGIDA DE DATOS

- *Cuestionario de Salud del Paciente (PHQ-9)*: Es una escala utilizada para valorar la presencia de cuadro depresivo y la necesidad de tratamiento farmacológico. Consta de 9 ítems con 4 opciones de respuesta: «No del todo», «Varios días», «Más de la mitad de los días» y «Casi todos los días» que se corresponden con valores entre 0 y 3. La puntuación total oscila entre 0 y 27 y se obtiene sumando las respuestas dadas. Se estima que pun-

tuciones de 5, 10, 15 y 20 representan puntos de corte correspondientes a «depresión leve», «depresión moderada», «depresión moderadamente grave» y «depresión severa» respectivamente. Se utilizó el cuestionario validado en lengua española [2] considerando la respuesta positiva en el ítem i («¿Ha pensado alguna vez que estaría mejor muerto, o ha deseado hacerse daño de algún modo?») como indicador de ideación suicida en los sujetos. La gravedad de la depresión, obviando la presencia o no de ideación suicida, se evaluó mediante las puntuaciones de las ocho preguntas iniciales, lo que a menudo se tipifica como PHQ-8.

- *Índice de Severidad del Insomnio (ISI)*: Mide la gravedad del insomnio. El cuestionario consta de 7 ítems, con 5 opciones de respuesta en escala tipo Likert, los cuales evalúan la severidad de los síntomas del insomnio, la calidad del sueño y el grado de satisfacción con este. La corrección se realiza sumando los resultados, oscilando la puntuación total entre 0 y 28 donde puntuaciones altas indican peor calidad del sueño. Se utilizó la validación española de este cuestionario [29].
- *Cuestionario de Impacto de Fibromialgia Revisado (FIQR)*: Evalúa la repercusión que tiene la enfermedad en la vida diaria de los pacientes. El cuestionario consta de un total de 21 ítems que se puntúan de 0 a 10. El cuestionario se divide en 3 apartados que analizan campos fundamentales de la enfermedad: funcionalidad, impacto global de la enfermedad y gravedad de la sintomatología. La puntuación total oscila entre 0 y 100. A mayor puntuación, mayor impacto global tiene la enfermedad en la calidad de vida de los pacientes. Este cuestionario se aplicó únicamente al grupo con fibromialgia, utilizándose la versión española validada [28].
- *Cuestionario de Necesidades Interpersonales (INQ)*: El cuestionario se creó para medir 2 factores; la sensación que tiene el individuo de ser una carga para los demás y el sentimiento de no pertenecer a un grupo. Se utilizó la versión de 12 ítems, 7 de los cuales evalúan el primer factor y los 5 restantes el segundo. Los sujetos tienen que indicar en una escala de 7 puntos tipo Likert, hasta qué grado le parecen ciertas las afirmaciones, donde 1 significaba «no del todo cierto para mí» y 7 «muy cierto para mí». Se utilizó en este estudio la traducción por dos autores al español del cuestionario inglés validado de la versión de 12 ítems [13]. La puntuación total de primer factor (sensación de ser una carga) puede oscilar entre 7 y 49 puntos y la del segundo (pertenencia frustrada) entre 5 y 35 puntos; en ambos casos mayores puntuaciones reflejan, respectivamente, mayor sensación de ser una carga y de pertenencia frustrada al grupo.
- *Escala de Riesgo Suicida de Plutchik*: Consta de 15 ítems de respuesta dicotómica que evalúan el grado en el que un individuo manifiesta tener conductas de tipo suicida o asociadas al riesgo de suicidio. Cada pregunta puntúa 1, siendo 15 la puntuación máxima y existiendo mayor riesgo de suicidio cuanto más elevada es la puntuación. El punto de corte que in-

dica riesgo sustancial de suicidio está establecido en 6 según la versión española validada [27].

- *Escala de Ajuste Marital de Locke-Wallace (LWMAT)*: Esta escala consta de 3 apartados en los que se desarrollan 15 ítems que evalúan la satisfacción y cohesión matrimoniales. La primera sección consiste en una pregunta en la que se pide una valoración general de la situación. El segundo apartado, que evalúa distintas áreas de la relación, está formado por 8 ítems con 6 opciones de respuesta en una escala tipo Likert (desde: «*Siempre en desacuerdo*» hasta «*Siempre de acuerdo*»). Por último, la tercera parte consta de 6 preguntas que evalúan el conflicto, la resolución, el compromiso y la comunicación mediante respuestas que van desde la incompatibilidad hasta la compatibilidad. La puntuación máxima, que se consigue con la sumatoria de todos los ítems, es 158. Puntuaciones mayores representan niveles más altos de satisfacción y felicidad conyugal. Se utilizó la versión validada en lengua española realizada en Chile [30].

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación de los datos se llevó a cabo mediante estadística paramétrica con análisis de varianza (ANOVA) usando el Test de Tukey para comparaciones múltiples y la estimación de la χ^2 para las variables categóricas. Se asumió significación estadística cuando $p < 0,05$ y se aceptaron valores del 95% y del 99% como intervalos de confianza.

Se aplicaron modelos de regresión logística binaria para estimar las «Odd Ratio» (OR) de ideación suicida y el riesgo de suicidio en el grupo con fibromialgia, ajustado por las variables sociodemográficas: sexo, edad, situación laboral, nivel de estudios y estado civil.

Se calcularon los coeficientes de correlación parcial entre las principales variables de interés para ambos grupos, sujetos sanos y pacientes con fibromialgia, controlando el efecto de las variables sociodemográficas citadas.

El procesamiento de los datos se llevó a cabo con los paquetes estadísticos SPSS v.22 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) y GraphPad Prism versión 5.04.

Resultados

Se entregaron un total de 116 cuestionarios de los cuales se desecharon 14 por no estar bien cumplimentados. De las 102 encuestas restantes; 53 pertenecían a pacientes diagnosticados de fibromialgia (FM) y 49 a sujetos sanos del grupo control (CRL).

Las principales variables sociodemográficas se recogen en la Tabla 1. La edad media del grupo con fibromialgia es superior a la del grupo control ($52 \pm 8,2$ frente a $47,6 \pm 11,7$, $p < 0,05$). Ambos grupos difieren también en el nivel de estudios ($p < 0,01$),

TABLA 1. Variables sociodemográficas de la muestra.

		CRL	FM	p
Edad (media $\pm$ DE)		47,6 $\pm$ 11,7	52,0 $\pm$ 8,2	0,028
Sexo	Mujeres	44 (90%)	51 (96%)	0,256
	Hombres	5 (10%)	2 (4%)	
Estado civil*	Con pareja	32 (65,3%)	37 (69,8%)	0,459
	Sin pareja	16 (32,7%)	15 (28,3%)	
Situación parental	Con hijos	38 (77,7%)	43 (81,1%)	0,807
	Sin hijos	11 (22,4%)	10 (18,9%)	
Nivel de estudios	Sin estudios	0 (0%)	1 (1,9%)	0,001
	Primarios	8 (16,3%)	28 (52,8%)	
	Bachiller	17 (34,7%)	15 (28,3%)	
	Universitarios	24 (49%)	9 (16,9%)	
Situación laboral	Trabaja en casa	4 (8,1%)	6 (11,3%)	0,001
	Trabaja fuera de casa	36 (73,5%)	16 (30,2%)	
	Desempleo	6 (12,2%)	7 (13,2%)	
	Baja laboral o transitoria	0 (0%)	6 (11,3%)	
	Invalidez permanente	0 (0%)	11 (20,7%)	
	Pensionista o jubilado	3 (6,1%)	7 (13,2%)	

CRL: controles; FM: pacientes con fibromialgia

* *Con pareja*: incluye a personas casadas o con pareja de hecho. *Sin pareja*: incluye a solteros sin pareja, separados, divorciados y viudos.

siendo mayor el porcentaje de estudios superiores en el grupo control (49%) frente al grupo con fibromialgia donde predominan los primarios (53%). Respecto a la situación laboral ($p < 0,01$), hay mayor porcentaje de sujetos trabajando en el grupo control (73,5%) mientras que en el grupo con fibromialgia prevalecen la baja laboral, la invalidez permanente y la jubilación por enfermedad.

Cabe destacar que ninguno de los sujetos del grupo control presentó ideación suicida (IS), mientras que un 28,3% de los sujetos del grupo con fibromialgia ($n=15$) respondieron positivamente a este ítem ($\chi^2=16,259$; $p < 0,01$). Asimismo, la presencia de riesgo de suicidio, considerada como una puntuación igual o superior a 6 puntos en la Escala Plutchik, fue también superior el grupo con fibromialgia ($n=41$; 77,4%) que en el grupo control ($n=5$; 10,2%) ($p < 0,001$).

Tal y como se recoge en la Tabla 2, una vez ajustados los datos en relación a las variables sociodemográficas, las OR tanto de la ideación suicida como del

TABLA 2. *Odd ratio (OR) de ideación suicida y riesgo de suicidio en pacientes con fibromialgia respecto a controles.*

	OR en grupo FM	IC 95%	p
Ideación suicida	19,054	2,405-150,935	0,005
Riesgo de suicidio	30,055	10,247-100,269	<0,001

Nota: Dato hipotético: un sujeto del grupo control ha manifestado ideación suicida.

TABLA 3. *Relación de figuras en las que se aprecian las puntuaciones medias obtenidas en los diferentes cuestionarios en el grupo control (CRL) y en el grupo con fibromialgia (FM) diferenciándose estos últimos en función de la presencia o no de ideación suicida (IS).*

Cuestionario		CRL	FM sin IS	FM con IS	p
PHQ-8		4,0 ± 3,5	13,3 ± 4,4***	18,9 ± 5,0 *****	0,0001
ISI		5,3 ± 4,6	16,3 ± 5,8***	18,3 ± 4,3***	0,0001
FIQ-R		—	66,5 ± 14,5	77,7 ± 13,2	0,1639
INQ	Carga	13,4 ± 5,4	18,9 ± 7,2***	29,7 ± 7,5 *****	0,0001
	Pertenencia	12,7 ± 6,2	15,4 ± 7,6	18,8 ± 5,9**	0,0073
LWMAT		120,2 ± 18,3	106,4 ± 28,6	80,9 ± 55,3 *****	0,0001

Datos expresados como media ± desviación estándar

***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05 en relación a CRL

*** p<0,001; ** p<0,01; *p<0,05 en relación a FM sin IS

riesgo de suicidio fueron significativamente mayores en el grupo con fibromialgia que en los controles.

Dado que en el grupo control ningún sujeto puntuó positivamente en el ítem relativo a la ideación suicida, para posibilitar el análisis, se estimó la OR asumiendo el caso hipotético de que un único sujeto del grupo control hubiera puntuado positivamente en esta variable.

En la Tabla 3 pueden observarse las puntuaciones obtenidas en los principales cuestionarios empleados en el estudio, por el grupo control y los grupos con fibromialgia sin ideación suicida y con ideación suicida.

TABLA 4. Coeficientes de correlación parcial entre las variables estudiadas controlando el efecto de las variables sociodemográficas y la ideación suicida.

Grupo	Cuestionarios		INQ Pertenencia	Plutchik	PHQ-8	ISI	PHQ ítem i
FM	INQ Carga	r	,393	,539	,541	,085	,499
		p	,005	,000	,000	,557	,000
	INQ Pertenencia	r	-	,634	,481	,051	,211
		p	-	,000	,000	,726	,142
	Plutchik	r	-	-	,557	,220	,272
		p	-	-	,000	,124	,056
	PHQ-8	r	-	-	-	,371	,600
		p	-	-	-	,008	,000
	ISI	r	-	-	-	-	,047
		p	-	-	-	-	,745
CRL	INQ Carga	r	,392	,420	,443	,355	-
		p	,007	,004	,002	,016	-
	INQ Pertenencia	r	-	,337	,176	,057	-
		p	-	,022	,242	,706	-
	Plutchik	r	-	-	,548	,467	-
		p	-	-	,000	,001	-
	PHQ-8	r	-	-	-	,570	-
		p	-	-	-	,000	-
	ISI	r	-	-	-	-	-
		p	-	-	-	-	-

CRL: controles. FM: pacientes con fibromialgia

En relación a la gravedad de la depresión, existen diferencias notables entre los tres grupos, siendo éstas mayores en los sujetos con fibromialgia y estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre el grupo control y los grupos con fibromialgia, y entre los grupos con fibromialgia con y sin ideación suicida ($p < 0,001$).

En lo que respecta a la calidad del sueño, se aprecian puntuaciones mayores en los individuos con fibromialgia que en los controles ($p < 0,001$), sin diferencia significativa entre los grupos con fibromialgia con y sin ideación suicida.

Respecto al impacto que tiene la enfermedad, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con fibromialgia con y sin ideación suicida.

En lo que se refiere al INQ, las puntuaciones respecto al sentimiento de ser una carga para los demás son significativamente superiores en los pacientes con fibromialgia que en los controles ($p<0,001$) con diferencias, asimismo, significativas entre los grupos con fibromialgia con y sin ideación suicida ($p<0,001$). Respecto a la sensación de no pertenencia al grupo, sólo se aprecian diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes con ideación suicida ($p<0,01$).

En relación al grado de satisfacción marital, se aprecia una marcada diferencia entre el grupo con fibromialgia e ideación suicida respecto al grupo control ($p<0,001$), así como una diferencia menos marcada entre el primero y los pacientes sin ideación suicida ($p<0,05$).

La Tabla 4 recoge las correlaciones parciales entre los diferentes cuestionarios. Se observa que estas apoyan los datos del análisis de varianza existiendo correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre la mayoría de variables estudiadas. En ambos grupos existen correlaciones positivas y significativas entre: la sensación de ser una carga para los demás, el sentimiento de no pertenecer a un grupo, las conductas de tipo suicida o asociadas al riesgo de suicidio y la intensidad de los síntomas depresivos.

Se aprecia que en el grupo con fibromialgia están muy asociados los factores psicosociales, incluida la ideación suicida y, en menor medida los factores propios de la enfermedad, como el insomnio que se asocia únicamente con los síntomas depresivos. Sin embargo, en el grupo control, la severidad del insomnio sí se correlaciona con la sensación de ser una carga, las conductas de tipo suicida y la depresión.

Discusión

Los resultados muestran que el factor psicosocial que más se asocia con la ideación suicida y el riesgo de suicidio es la sensación de ser una carga para los demás, seguido de una mala relación de pareja y, en menor medida, el sentimiento de no pertenecer a un grupo. También se ha encontrado que la ideación suicida y el riesgo de suicidio son más prevalentes en pacientes con fibromialgia que en controles, siendo los factores psicosociales más influyentes que los propios de la enfermedad, a excepción de la depresión, que es el factor que mayor asociación muestra con la ideación suicida.

También se ha observado que el sentimiento de ser una carga para los demás es frecuente en pacientes con fibromialgia, afectando más a aquellos pacientes que manifiestan ideación suicida. Dicho sentimiento se correlaciona positivamente en el estudio con la sensación de no pertenecer a un grupo, los síntomas depresivos y el riesgo de suicidio evaluado mediante la escala de Plutchik.

Numerosos autores han estudiado este factor considerándolo predictor de conductas suicidas. Cukrowitz et al [11] tras estudiar ambos componentes del INQ en personas mayores, establecieron que la sensación de ser una carga era el factor que mayor relación guardaba con la ideación suicida. Jahn et al. [18] también

midieron la sensación de ser una carga en una muestra de ancianos evaluada mediante la *Escala geriátrica de ideación suicida*, observando, asimismo, que la sensación de ser una carga se asociaba con la ideación suicida. En el estudio de Garza et al. [15] se administró el INQ a una muestra de mujeres mexicanas encontrando también una asociación entre la sensación de ser una carga y la ideación suicida. Bryan [8] también encontró que la sensación de ser una carga se asociaba con la ideación suicida. Kanzler et al. [21] por su parte, evaluaron la ideación suicida en pacientes con dolor crónico, encontrando que la sensación de ser una carga era el factor que más se relacionaba con ésta. Cabe señalar que los resultados del presente estudio coinciden con los hallados en los trabajos anteriores a este respecto.

Se observa en los resultados que la sensación de no pertenecer a un grupo se asocia con la severidad de la depresión y con el riesgo de suicidio, mientras que no se relaciona con la ideación suicida. La mayoría de los autores anteriormente citados obvian la influencia de la pertenencia frustrada, no haciéndola constar en sus resultados [11, 21, 15] o no examinándola, por utilizar una escala distinta [18], en sus muestras de estudio. El único estudio, ya citado, que consideró importantes los dos componentes del INQ fue el llevado a cabo por Bryan [8]; encontró que ambos factores se asociaban con la ideación suicida, aunque la pertenencia frustrada lo hacía con menor intensidad que la sensación de ser una carga, resultados que concuerdan con los del presente estudio. Así pues, de los dos factores que componen el INQ, la sensación de no pertenecer a un grupo puede considerarse menos influyente respecto a la ideación suicida, que la sensación de ser una carga para los demás.

Con respecto a las relaciones de pareja, los resultados muestran que el grado de satisfacción marital es menor en el grupo con fibromialgia, siendo inferior entre los sujetos que manifiestan ideación suicida. Dado que no existen estudios previos que hayan evaluado la posible relación entre la ideación suicida y las relaciones de pareja, y debido al hecho de que la soledad o el estar separado son factores de riesgo para desarrollar conductas suicidas, sería interesante evaluar y profundizar en este tema en estudios posteriores.

La prevalencia de ideación suicida en la muestra de pacientes con fibromialgia (n=53) fue del 28,3%, mientras que en otros estudios previamente mencionados osciló entre el 32,5 [31] y el 48% [9] de la muestra estudiada. Estos trabajos utilizaron como instrumento de medida el *Inventario de Depresión de Beck* para evaluar la presencia de ideación suicida, mientras que en este estudio se administró el PHQ-9 para valorar este factor y la gravedad de la sintomatología depresiva. A pesar de la disparidad entre las cifras se observa que la prevalencia de ideación suicida en pacientes con fibromialgia es elevada. Cabe recordar que la prevalencia de ideación suicida observada en la población general española es del 4,4% [14], porcentaje considerablemente inferior a los observados en pacientes con fibromialgia.

Como se citó anteriormente, la asociación entre el dolor crónico y la ideación suicida ha sido estudiada en varios trabajos [26, 6, 17, 16, 21] de los que sólo dos incluyeron una muestra de pacientes con fibromialgia. Ratcliffe et al. [26] al evaluar la asociación entre patologías que cursan con dolor crónico e ideas e intentos

de suicidio, encontraron que, tras controlar factores sociodemográficos, la fibromialgia, entre otras patologías se asociaba con ideación suicida, mientras que la asociación desaparecía tras controlar en función de la comorbilidad psiquiátrica. Ilgen et al. [17] por su parte, evaluaron si el riesgo de suicidio se asociaba con distintos tipos de dolor no oncológico encontrando, en la muestra con fibromialgia, datos similares a los anteriores, que tras ajustar según características sociodemográficas existía asociación entre la fibromialgia y la ideación suicida y sin embargo, al controlar el efecto de los trastornos mentales esta relación desaparecía. Ello que indicaría que es la comorbilidad psiquiátrica la que se asocia con la ideación suicida.

Los estudios de Triñanes et al. [31] y Calandre et al. [9, 19] en los que las muestras de pacientes con fibromialgia son más pequeñas, encuentran igualmente relación entre la ideación suicida y la enfermedad. Estos estudios, que controlan características sociodemográficas, pero no la comorbilidad psiquiátrica, encuentran una estrecha asociación entre la ideación suicida y los síntomas depresivos, lo que muestra una similitud con los hallazgos citados de los anteriores autores. Los resultados de este estudio concuerdan con los mencionados previamente, ya que la depresión mantiene una estrecha relación con la ideación suicida y el riesgo de suicidio, así como una fuerte asociación con la sensación de ser una carga para los demás; mientras que el dolor, la baja calidad del sueño y la gravedad de los síntomas propios de la enfermedades medida con el FIQR, son factores relativamente poco influyentes respecto a la ideación suicida en estos pacientes. Estos resultados coinciden con los publicados recientemente por el grupo de Calandre [9, 10]. Por ello, cabría afirmar que la sintomatología depresiva sería el factor de riesgo más relevante para desarrollar ideas de tipo suicida en pacientes con fibromialgia.

Entre las fortalezas de este estudio se ha de señalar, en primer lugar, que es el primer trabajo que evalúa en pacientes con fibromialgia, la relación entre la ideación suicida con la sensación de ser una carga y el sentimiento de no pertenecer a un grupo. En segundo lugar, destacar que es también la primera vez que se ha medido la influencia de un buen ajuste marital en pacientes con fibromialgia.

Entre las limitaciones de este estudio cabe resaltar que al tratarse de un estudio trasversal, no se pudieron establecer relaciones de causalidad entre la ideación suicida y los parámetros estudiados de la fibromialgia.

Otra limitación de este estudio fue que el tamaño muestral fue pequeño. En futuros trabajos, sería recomendable reclutar un mayor número de sujetos puesto que, probablemente, habrían podido recogerse casos de individuos sanos con ideación suicida.

La disparidad entre las muestras en relación a la edad, el nivel de estudios y la situación laboral fueron también una limitación en este estudio. Aunque la diferencia en la edad de controles y pacientes fue estadísticamente significativa, no se considera clínicamente relevante puesto que la variación fue sólo de 5 años. En lo que corresponde al nivel de estudios, cabe destacar que primaron los estudios superiores entre controles y los primarios entre pacientes, hecho que hubiera sido deseable controlar reclutando una muestra más homogénea, ya que en la población general con fibromialgia predominó un nivel de estudios bajo, factor que se

ha asociado con la ideación suicida. Con respecto a la situación laboral, cabe señalar que existió mayor porcentaje de sujetos trabajando en el grupo control, mientras que entre los pacientes predominaron la baja laboral y la invalidez permanente, circunstancia inevitable puesto que la fibromialgia es una enfermedad crónica invalidante. No obstante, estas disparidades fueron controladas en el análisis de los datos. Tampoco se estudiaron las comorbilidades de los pacientes con fibromialgia, por lo que no se puede saber si, a mayor número de síntomas asociados mayor presencia de ideación o riesgo suicida.

Por último se debe recordar que en la muestra de estudio ningún sujeto del grupo control manifestó ideación suicida, por lo que se realizó una aproximación simulando que un único individuo de este grupo hubiera puntuado positivamente en este ítem, para facilitar el análisis de los resultados.

A pesar de las limitaciones mencionadas, podemos concluir que la ideación suicida y el riesgo de suicidio son prevalentes en pacientes con fibromialgia, siendo los factores psicosociales más influyentes que los propios de la enfermedad, exceptuando la sintomatología depresiva, componente que mayor asociación muestra con la ideación suicida. Sería deseable realizar estudios adicionales para desarrollar estrategias dirigidas a prevenir las conductas suicidas en pacientes con fibromialgia.

Conflicto de intereses

Este estudio no tiene conflicto de intereses.

Agradecimientos

A todos los participantes que generosamente se prestaron a participar en este trabajo.

Bibliografía

1. Arnold LM, Clauw DJ, McCarberg DH, et al. Improving the recognition and diagnosis of fibromyalgia. *Mayo Clin Proc* 2011;86:457-464.
2. Baader TM, Molina JF, Venezian SB et al. Validity and utility of PHQ9 (Patient Health Questionnaire) in the diagnosis of depression in user patients of primary care in Chile. *Rev Chil Neuro-Psiquiat*. 2012;50:10-22.
3. Batterham PJ, Fairweather-Schmidt AK, Butterworth P, et al. Temporal effects of separation on suicidal thoughts and behaviours. *Soc Sci Med* 2014;111:58-63.
4. Beghi M, Rosenbaum JF, Cerri C, et al. Risk factors for fatal and nonfatal repetition of suicide attempts. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2013; 9:1725-1736.
5. Bernert RA, Joiner TE. Sleep disturbances and suicide risk: a review of the literature. *Neuropsychiatric Dis Treat* 2007;3:735-743.

6. Braden JB, Sullivan MD. Suicidal thoughts and behavior among adults with self-reported pain conditions in the national comorbidity survey replication. *J Pain*. 2008;9:1106-1115.
7. Branco JC, Bannwarth B, Failde I, et al. Prevalence of fibromyalgia: a survey in five European countries. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39:448-453.
8. Bryan CJ. The clinical utility of a brief measure of perceived burdensomeness and thwarted belongingness for the detection of suicidal military personnel. *J Clin Psychol* 2011;67:981-992.
9. Calandre EP, Navajas-Rojas MA, Ballesteros J, et al. Suicidal Ideation in Patients with Fibromyalgia: A Cross-Sectional Study. *Pain Pract* 2014. doi: 10.1111/papr.12164
10. Calandre EP, Vílchez JS, Molina-Barea R, et al. Suicide attempts and risk of suicide in patients with fibromyalgia: a survey in Spanish patients. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50:1889-1893.
11. Cukrowicz KC, Cheavens JS, Van Orden KA, et al. Perceived burdensomeness and suicide ideation in older adults. *Psychol Aging* 2011;26:331-338.
12. Dreyer L, Kendall S, Danneskiold-Samsøe B, et al. Mortality in a cohort of Danish patients with fibromyalgia: increased frequency of suicide. *Arthritis Rheum*. 2010;62:3101-108.
13. Freedenthal S, Lamis DA, Osman A, et al. Evaluation of the psychometric properties of the Interpersonal Needs Questionnaire-12 in samples of men and women. *J Clin Psychol* 2011;67:609-623.
14. Gabilondo A, Alonso J, Pinto-Meza A, et al. Prevalencia y factores de riesgo de las ideas, planes e intentos de suicidio en la población general española. Resultados del estudio ESEMeD. *Med Clin (Barc)* 2007;129:494-500.
15. Garza MJ, Pettit JW. Perceived burdensomeness, familism, and suicidal ideation among Mexican women: enhancing understanding of risk and protective factors. *Suicide Life Threat Behav* 2010;40:561-73.
16. Ilgen MA, Kleinberg F, Ignacio RV, et al. Noncancer pain conditions and risk of suicide. *JAMA Psychiatry*. 2013;70:692-697.
17. Ilgen MA, Zivin K, McCammon RJ, et al. Pain and suicidal thoughts, plans and attempts in the United States. *Gen Hosp Psychiatry* 2008;30:521-527.
18. Jahn DR, Cukrowicz KC, Linton K, et al. The mediating effect of perceived burdensomeness on the relation between depressive symptoms and suicide ideation in a community sample of older adults. *Aging Ment Health* 2011;15:214-20.
19. Jiménez-Rodríguez I, García-Leiva JM, Jiménez-Rodríguez BM et al. Suicidal ideation and the risk of suicide in patients with fibromyalgia: a comparison with non-pain controls and patients suffering from low-back pain. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014;10:625-630.
20. Joiner TE. Why people die by suicide. Cambridge, MA: Harvard University Press. Publishing; 2005.
21. Kanzler KE, Bryan CJ, McGeary DD, et al. Suicidal Ideation and Perceived Burdensomeness in Patients with Chronic Pain. *Pain Practice* 2012;12:602-609.
22. Kessler RC, Borges G, Walters EE. Prevalence of and risk factors for lifetime suicide attempts in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatr* 1999;56:617-626.

23. Nock MK, Borges G, Bromet EJ, et al. Cross-national prevalence and risk factors for suicidal ideation, plans and attempts. *Br J Psychiatry* 2008;192:98–105.
24. Pigeon WR, Pinquhart M, Conner K. Meta-analysis of sleep disturbance and suicidal thoughts and behaviors. *J Clin Psychiatry* 2012;73:e1160-1167.
25. Queiroz LP. Worldwide epidemiology of fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep* 2013;17:356.
26. Ratcliffe GE, Enns MW, Belik SL, et al. Chronic pain conditions and suicidal ideation and suicide attempts: an epidemiological perspective. *Clin J Pain* 2008;24:204-210.
27. Rubio G, Montero I, Jáuregui J et al. Validación de la escala de riesgo suicida de Plutchik en la población española. *Arch Neurobiol* 1998;61:143-152.
28. Salgueiro M, García-Leiva JM, Ballesteros J, et al. Validation of a Spanish version of the Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQR). *Health Qual Life Outcomes* 2013;11:132. doi: 10.1186/1477-7525-11-132.
29. Sierra JC, Guillen-Serrano V, Santos-Iglesias P. Insomnia Severity Index: Some indicators about its reliability and validity on an older adults sample. *Rev Neurol* 2008;15;47:566-570.
30. Tapia L, Poulsen G. La evaluación del Ajuste marital. Santiago de Chile, Ed: Facultad de Psicología. Publicado: 2008.
31. Triñanes Y, González-Villar A, Gómez-Perretta C, et al. Suicidality in Chronic Pain: Predictors of Suicidal Ideation in Fibromyalgia. *Pain Practice* 2014. doi: 10.1111/papr.12186
32. Van Orden KA, Witte TK, Gordon KH, et al. Suicidal desire and the capability for suicide: tests of the interpersonal-psychological theory of suicidal behavior among adults. *J Consult Clin Psychol* 2008;76:72-83.
33. Wolfe F, Hassett A L, Walitt B, et al. Mortality in fibromyalgia: A study of 8,186 patients over thirty-five years. *Arthritis Care Res* 2011;63:94–101.
34. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1990;33:160-172.
35. Wolfe F. Fibromyalgia: the clinical syndrome. *Rheum Dis Clin* 1989;15:1-18.



Comparison between a gluten-free diet versus a hypocaloric diet among patients with fibromyalgia experiencing gluten sensitivity symptoms: Preliminary results of a pilot, open-label, randomized clinical trial

Slim M, Molina-Barea R, García-Leiva JM, Rodríguez-López CM, Morillas-Arqués P, Rico-Villademoros F, Calandre EP

Abstract

Background. Fibromyalgia is a chronic musculoskeletal pain syndrome characterized by a broad spectrum of manifestations. Patients with fibromyalgia frequently suffer symptoms similar to those experienced by patients with gluten-related disorders, raising the possibility that some patients with fibromyalgia could experience underlying gluten sensitivity. This study aims to evaluate the effects of a gluten-free diet as compared to a hypocaloric diet among patients with fibromyalgia.

Methods. Adult patients with fibromyalgia presenting overlapping gluten sensitivity symptoms were randomly allocated to receive gluten-free diet (n= 29) or hypocaloric diet (n= 29) over 24 weeks. The primary outcome measure was the mean change in the number of experienced gluten sensitivity symptoms. Secondary outcome measures included the mean changes in the Body Mass Index, Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire, Pittsburgh Sleep Quality Index, Brief Pain Inventory, Beck Depression Inventory-II, State-Trait Anxiety Inventory, Short-Form Health Survey and Patient Global Impression Scale of severity. Other secondary outcome measures included the frequency of potential adverse events and the proportion of responders according to Patient Global Impression Scale of improvement.

Results. The mean change in the total number of gluten-sensitivity symptoms between baseline and study endpoint didn't differ significantly between the GFD and HCD groups (-2.41 ± 2.52 vs. -2.48 ± 2.97 , respectively, $p= 0.6823$), whereas significant time-dependent drop in the number of these symptoms was seen in both

groups ($p < 0.0001$). A more significant drop in the BMI was seen in the HCD group as compared to GFD group (-0.9 ± 1.4 vs. -0.7 ± 1.1 , respectively, $p = 0.0163$). Time-significant changes were obtained in both dietary groups with respect to the scores of FIQR, PSQI and BPI-severity. PGI scores didn't differ significantly between the two groups ($p = 0.3152$) and both dietary interventions were well tolerated.

Conclusion. The adoption of GFD in our study has been associated to time-dependent decrease in the number of gluten sensitivity symptoms. The non-significant differences in these outcomes between GFD and HCD indicate the lack of any specificity for the GFD as previously hypothesized. The benefit from GFD might be limited to a subgroup of patients with fibromyalgia whose specific clinical profile warrant further investigation.

Keywords: *Fibromyalgia, gluten sensitivity symptoms, gluten-free diet, hypocaloric diet, randomized clinical trial*

Introduction

Fibromyalgia syndrome is a chronic musculoskeletal pain disorder that affects 2-5% of the general population [22]. Chronic generalized musculoskeletal pain, the cardinal symptom that defines this syndrome, is characterized by a bilateral nature affecting the left and right sides of the body in addition to the regions below and above the waist [33]. Although pain is the prominent feature of fibromyalgia, other disabling symptoms, such as morning stiffness, sleep disturbances, chronic fatigue, cognitive difficulties, balance problems, psychological distress (depression and/or anxiety) and hypersensitivity to environmental stimuli, coexist with it and contribute to a more complex clinical presentation [2].

The diagnosis of fibromyalgia is established based on a clinical evaluation of patients. Initial diagnostic criteria were proposed by Smythe in 1972 and 1977 [34, 35] followed by the set of diagnostic criteria suggested by Yunus et al. in 1981 [45]. However, it was not until 1990 that the first official diagnostic criteria for fibromyalgia were suggested by the American College of Rheumatology (ACR) [44], requiring the presence of tenderness in at least 11 out of 18 musculoskeletal tender points lasting a minimum of 3-month period. These criteria were later modified in 2010 by introducing the Widespread Pain Index (WPI) without the requirement to explore tender points, and adding a Symptom Severity Scale (SS) that evaluates the intensity of fatigue, sleep problems, cognitive dysfunction, and other somatic symptoms [43]. Eventually, the 2010 preliminary diagnostic criteria were further modified in 2011 by proposing the new Fibromyalgia Symptom Scale (FS) which combines the WPI and modified-SS scales in an attempt to facilitate self-administration by patients [42].

Gastrointestinal manifestations, frequently reported by patients with fibromyalgia, were first referred to as IBS-like symptoms [45]. They were initially attributed

to the common comorbidity between fibromyalgia and IBS, which has been shown to range between 32% and 81% [13, 36, 40]. However, a considerable proportion of patients with fibromyalgia present non-specific gastrointestinal symptoms [19, 38], which are not sufficient to establish a diagnosis of IBS. Thus, a complete understanding of the mechanisms underlying the appearance of these manifestations is not yet established and several factors could be involved among which is the hypersensitivity to food components such as gluten.

Gluten-related disorders encompass a spectrum of conditions that include wheat allergy, celiac disease, dermatitis herpetiformis, gluten ataxia and non-celiac gluten-sensitivity (NCGS) [28]. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity share a wide array of clinical manifestations (despite the autoimmune nature of the former and the possible immune-mediated nature of the latter) so that they cannot be clinically distinguished. These manifestations include gastrointestinal symptoms such as diarrhea, abdominal pain, bloating and extraintestinal symptoms such as tiredness, fatigue, foggy mind, bone pain, headache, anemia, depression and anxiety [16, 21, 28].

A considerable overlap in the symptomatology spectrum of fibromyalgia and gluten-related disorders exists [10] suggesting a possible role of gluten sensitivity in at least a subgroup of patients with fibromyalgia who present gastrointestinal manifestations [31]. Furthermore, the increased susceptibility to multiple chemical sensitivity disorders [32] and the frequent hypersensitivity to food components experienced by patients with fibromyalgia [6, 20] support the notion of questioning the potential role for gluten sensitivity in the appearance of gastrointestinal symptoms among this group of patients.

Symptomatic aggravation secondary to the intake of specific foods is a commonly perceived ideation of a considerable proportion of patients with fibromyalgia who also believe that dietary interventions are linked to a significant symptomatic benefit [11]. Thus, a general tendency exists toward adopting dietary interventions by up to 30% of patients with fibromyalgia [3]. Several attempts have been undertaken to investigate the benefit of several dietary interventions such as vegetarian diet, vegan diet, elimination diet and Mediterranean diet with variable outcomes being reported [4]. Also, the high prevalence of overweight in fibromyalgia and the positive correlation between the body mass index and functional difficulties and physical dysfunction [1, 17, 18, 46] lead to the subsequent investigation of the effects of balanced deficit diets promoting weight loss in fibromyalgia which was shown to be linked to pain reduction and improvement of quality of life [29, 30].

Randomized controlled clinical trials investigating the role of dietary interventions in fibromyalgia are scanty and to date, the role of gluten-free diet (GFD) in fibromyalgia has not been investigated in any randomized-controlled trial. We designed a randomized controlled pilot clinical trial to compare the effects of GFD as compared to a hypocaloric diet (HCD) among patients with fibromyalgia presenting overlapping manifestations of gluten sensitivity. The primary ob-

jective was to compare the effects of these dietary interventions on the number of experienced gluten sensitivity symptoms. Secondary objectives included comparing the effects of these diets on fibromyalgia symptoms (including the impact and the severity of the disease), sleep problems, pain intensity, depression, anxiety, quality of life and tolerability. The current communication reports the preliminary results of a sample of 64 patients who were recruited into our study before September of 2013.

Methods

This pilot study was a single-center, randomized, open-label, parallel-group, 24-week clinical trial. Eligible patients were randomly assigned to receive a gluten-free or a hypocaloric diet added to their current therapeutic regimen. All subjects underwent a baseline assessment during which patients' demographic and clinical data, medical history, and current pharmacologic therapies were recorded. A thorough explanation of the corresponding diet was ensured to reinforce the adequate adherence to the diet. A detailed reference document, which included a comprehensive explanation, of each diet was provided to every participant. Participants allocated to any of the two interventions were instructed about the importance of the strict compliance to the diet as transgressions, whether voluntary or involuntary, could eliminate any potential benefit and represent a protocol violation.

Inclusion criteria were the following: adult patients diagnosed with fibromyalgia according to the ACR 2010 diagnostic criteria [43], presenting at least 5 from a total of 14 gluten sensitivity symptoms (Table 1) and negative transglutaminase antibodies serological testing. Exclusion criteria included the presence of any disease that could prevent them from following any of the anticipated diet protocols, current or previous history of substance abuse and pregnancy or lactation. This study was carried out at the Institute of Neuroscience at the University of Granada, a tertiary health care center. Participants were referred to our investigation group from patients' associations or by their physicians. All study subjects provided a signed informed consent to participate in the current study which was approved by the Medical Ethics Committee of the University of Granada. The trial registration number is NCT01881360.

Patients were followed up during 24 weeks. During the first 12 weeks of the study, a follow-up by phone was performed two weeks following randomization and an evaluation visit was scheduled every 4 weeks and patients were instructed to maintain their current therapeutic regimen without any modification. During the second 12 weeks of the study, an evaluation visit was scheduled every 6 weeks. Dosage adjustments of pharmacologic treatments, if necessary, could be made by the investigator on week 12 of the study and later maintained constant until the end of the study. The flow chart in Figure 1 illustrates the participants' flow throughout the study.

TABLE 1. List of gluten sensitivity symptoms

Gastrointestinal symptoms	Abdominal pain
	Bloating
	Diarrhea/constipation or alternation of both
	Lactose intolerance
	Alteration in the hepatic function ¹
	Nausea and/or vomiting
	Dyspepsia
	Pyrosis
	Steatorrhea
Extra-intestinal symptoms	Paresthesias
	Cutaneous lesions ²
	Ankle edema
	Weight changes
	Reproductive disorders ³
	Anemia

1. Alterations in the normal hepatic function detected in previous analytical testing reported by the patient.

2. Oral aphthous ulcers /dermatitis/frequent itching.

3. Late menarche/ irregular menstruation/early menopause/spontaneous abortions/fertility problems.

The primary outcome measure was the mean change in the number of experienced gluten sensitivity symptoms between baseline and study endpoint. Secondary outcome measures included the mean changes between baseline and study endpoint in the Body Mass Index (BMI), Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQR), Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), Brief Pain Inventory (BPI), Beck Depression Inventory-II (BDI-II), State-Trait Anxiety Inventory (STAI), Short-Form Health Survey (SF-12) and Patient Global Impression Scale of severity. All outcome measures were tested using Spanish-validated instruments [25, 26, 27, 37, 41]. Other secondary outcome measures included the frequency of potential adverse events and the proportion of responders according to Patient Global Impression Scale of improvement. Follow-up assessment visits were scheduled on weeks 4, 8, 12, 18, and 24.

Baseline demographic and clinical characteristics of the participants of both groups were analyzed using descriptive statistics. Data were analyzed in a mod-

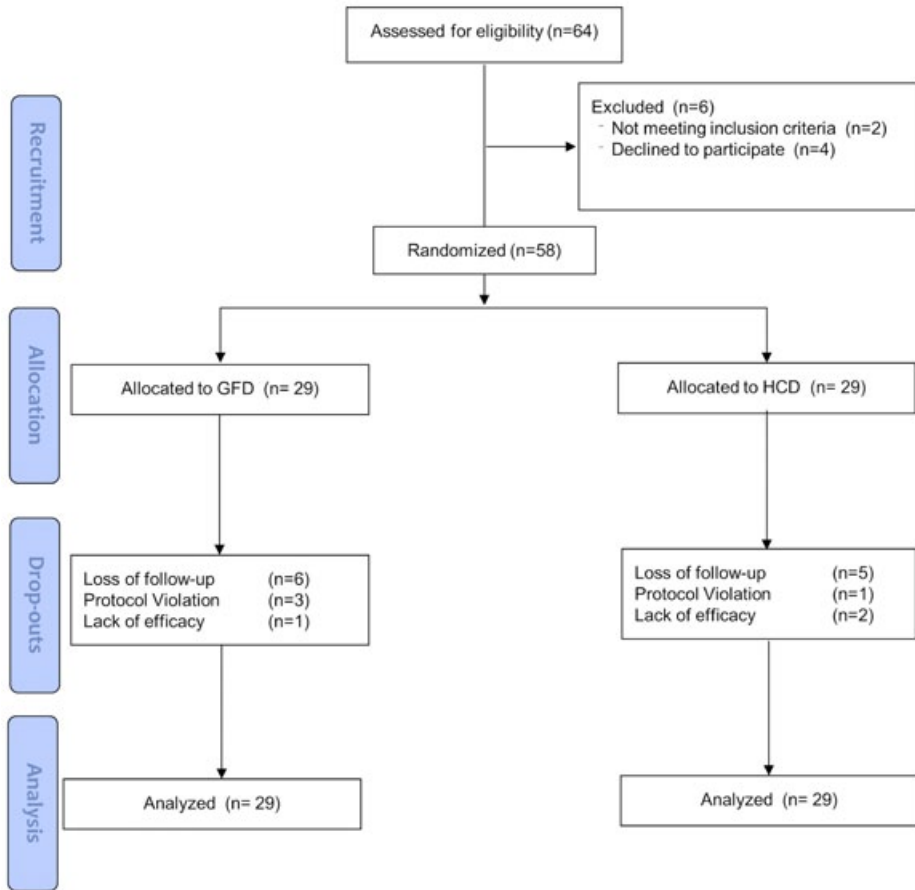


FIGURE 1. Flow chart of the study

ified intention-to-treat (ITT) population; patients who completed at least one visit following diet initiation were included in the final analysis and missing values were imputed using the last observation carried forward (LOCF). For the continuous variables with normal distribution, the comparison between the two groups was conducted using Student's t test. Two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the significance of the participants' evolution within each group and between the two groups by comparing the differences of paired data scores at different time points compared to baseline. Fisher's exact test or chi-squared test were used for analyzing qualitative outcome variables such as PGI and adverse events data. A p-value <0.05 was

TABLE 2. Baseline demographic and clinical characteristics

	GFD (n=29)	HCD (n= 29)
Gender	N (%)	N(%)
F	29 (100%)	27 (93.1%)
M	0	2 (6.9%)
Age	52.1 ± 6.7	51.6 ± 9.1
Gluten-sensitivity symptoms	12.7 ± 2.6	12.5 ± 2.3
BMI	27.3 ± 6.3	31.2 ± 5.5
FIQR	72.4 ± 15.7	71.7 ± 15.1
PSQI	16.1 ± 3.2	15.0 ± 3.5
BPI-Sev	6.9 ± 1.7	7.1 ± 1.3
BPI-Interf	7.5 ± 1.6	7.4 ± 1.6
BDI-II	31.7 ± 11.4	30.5 ± 11.9
STAI (State)	37.0 ± 11.4	36.9 ± 11.8
STAI (Trait)	40.5 ± 10.2	39.6 ± 11.3
SF-12 Physical	27.9 ± 4.7	27.1 ± 6.0
SF-12 Mental	31.4 ± 9.0	33.2 ± 12.1

Data are expressed as mean ± standard deviation

considered statistically significant. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism® 5 for Windows, Version 5.04 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Results

Among the first 64 patients recruited into our study, 6 patients were excluded and 58 were randomly allocated to one of the two diets: GFD (n= 29) and HCD (n= 29) (Figure 1). Patients' baseline demographic and clinical characteristics are shown in Table 2. Ten patients from the GFD group failed to complete the study as compared to 8 patients from the HCD. Reasons of withdrawal are illustrated in Figure 1, with the loss of follow-up being the most frequent cause.

The mean change in the total number of gluten-sensitivity symptoms between baseline and study endpoint didn't differ significantly between the GFD and HCD groups (-2.41 ± 2.52 vs. -2.48 ± 2.97 , respectively, $p= 0.6823$), whereas significant drop in the number of these symptoms was seen in both groups with

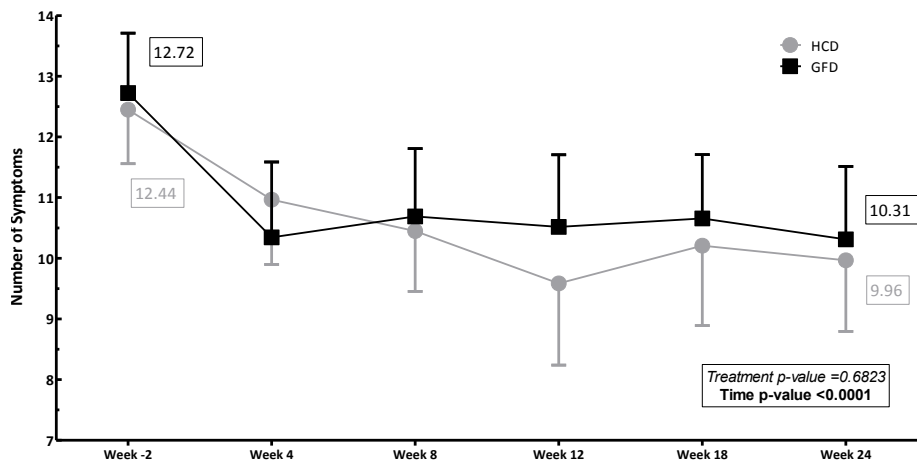


FIGURE 2. Change in the number of gluten sensitivity symptoms.

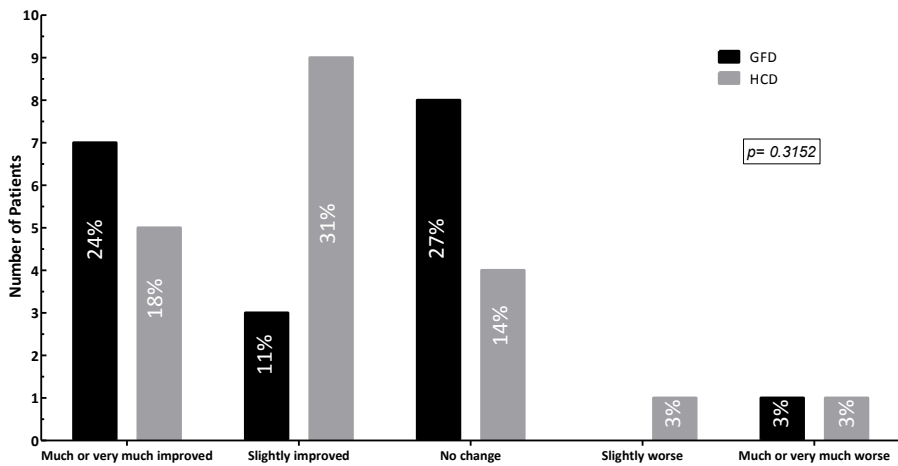


FIGURE 3. Patient global impression of improvement on week 24.

respect to time ($p < 0.0001$) (Figure 2). Results of the secondary outcomes measures are presented in Table 3. A more significant drop in the BMI was seen in the HCD group as compared to GFD group (-0.9 ± 1.4 vs. -0.7 ± 1.1 , respectively,

TABLE 3. Changes in secondary outcomes measures throughout the study.

Outcome		Week	Baseline	Week 4	Week 8	Week 12	Week 18	Week 24	Mean change*	p-values Interaction Time Treatment
BMI (Kg/ m ²)	GFD		27.3 ± 6.3	26.5 ± 5.9	26.9 ± 6.1	26.7 ± 6.0	26.6 ± 6.0	26.6 ± 6.0	-0.7 ± 1.1	0.5660
	HCD		31.2 ± 5.5	30.6 ± 5.3	30.4 ± 5.4	30.3 ± 5.4	30.3 ± 5.4	30.2 ± 5.3	-0.9 ± 1.4	< 0.0001 0.0163
FIQR	GFD		72.4 ± 15.7	67.1 ± 19.6	68.9 ± 17.0	68.6 ± 14.6	65.5 ± 16.8	63.7 ± 18.3	-8.7 ± 12.2	0.8696
	HCD		71.7 ± 15.1	67.2 ± 19.1	66.8 ± 17.1	66.5 ± 19.4	65.6 ± 20.4	65.2 ± 21.2	-6.5 ± 16.3	0.0002 0.9040
PSQI	GFD		16.1 ± 3.2	14.0 ± 4.1	14.5 ± 3.5	14.6 ± 3.3	14.1 ± 3.7	15.1 ± 3.2	-1.0 ± 3.2	0.2172
	HCD		15.0 ± 3.5	14.4 ± 4.1	15.0 ± 3.8	13.9 ± 4.8	14.3 ± 4.5	14.4 ± 4.6	-0.6 ± 4.6	0.0114 0.8031
BPI-Sev	GFD		6.9 ± 1.7	6.5 ± 2.2	6.2 ± 2.0	6.6 ± 1.9	6.4 ± 2.1	6.4 ± 2.2	-0.5 ± 1.5	0.9514
	HCD		7.1 ± 1.3	6.6 ± 1.9	6.5 ± 1.6	6.5 ± 1.8	6.4 ± 2.0	6.4 ± 2.1	-0.6 ± 1.6	0.0062 0.8405
BPI-Int	GFD		7.5 ± 1.6	7.2 ± 2.0	7.2 ± 1.6	7.3 ± 1.6	6.8 ± 2.1	7.0 ± 2.0	-0.5 ± 1.7	0.7273
	HCD		7.4 ± 1.6	6.9 ± 2.1	7.0 ± 1.8	6.9 ± 2.0	7.0 ± 2.2	6.8 ± 2.1	-0.6 ± 1.4	0.0548 0.7035
BDI-II	GFD		31.7 ± 11.4	30.6 ± 13.4	30.6 ± 11.5	31.0 ± 11.8	29.3 ± 12.7	28.9 ± 11.8	-2.8 ± 7.4	0.7636
	HCD		30.5 ± 11.9	28.6 ± 11.9	29.1 ± 12.1	28.9 ± 11.8	29.6 ± 13.6	29.0 ± 13.3	-1.6 ± 9.3	0.3832 0.7218
STAI S/A	GFD		36.9 ± 11.4	37.4 ± 11.0	37.9 ± 9.1	38.8 ± 11.2	36.1 ± 11.4	37.8 ± 10.4	0.9 ± 10.8	0.7523
	HCD		36.9 ± 11.8	37.8 ± 11.2	38.3 ± 10.8	37.8 ± 11.5	38.3 ± 12.1	37.2 ± 10.7	0.4 ± 9.7	0.7897 0.9337
STAI T/A	GFD		40.5 ± 10.2	41.1 ± 9.1	41.3 ± 9.3	41.9 ± 8.4	40.1 ± 9.4	40.9 ± 8.7	0.3 ± 9.9	0.3407
	HCD		39.6 ± 11.3	38.5 ± 10.2	40.5 ± 9.3	39.4 ± 10.9	39.3 ± 10.8	36.6 ± 9.9	-3.0 ± 9.1	0.2291 0.3899
SF-12 PCS	GFD		27.9 ± 4.7	28.9 ± 4.9	28.9 ± 5.4	28.8 ± 5.2	28.0 ± 4.6	29.2 ± 5.0	1.3 ± 5.0	0.4355
	HCD		27.1 ± 6.0	27.5 ± 5.3	29.0 ± 6.4	28.6 ± 5.6	29.1 ± 5.7	29.9 ± 5.3	2.7 ± 5.9	0.0523 0.9495
SF-12 MCS	GFD		31.4 ± 9.1	29.4 ± 9.1	31.4 ± 8.3	30.7 ± 9.7	31.2 ± 10.7	32.7 ± 10.4	1.3 ± 8.3	0.3779
	HCD		33.2 ± 12.1	33.9 ± 13.4	32.0 ± 11.3	34.1 ± 12.0	33.9 ± 12.1	32.7 ± 12.1	-0.5 ± 9.1	0.9275 0.4062

Data are expressed as mean ± standard deviation.

*Mean change between baseline and end point.

BDI-II: Beck-depression inventory-II. BMI: body mass index.

BPI: brief pain inventory. FIQR: revised fibromyalgia impact questionnaire.

GFD: gluten-free diet. HCD: hypocaloric diet.

MCS: mental component scale. PCS: physical component scale.

PSQI: Pittsburgh sleep quality index. SF-12: short-form health survey.

STAI: State-Trait anxiety inventory. S/A: state anxiety; T/A: trait anxiety.

$p=0.0163$). Similar to the results obtained with the primary outcome measure, only time-significant changes were seen in both dietary groups with respect to the scores of FIQR, PSQI and BPI-severity. Neither time nor treatment effects were seen with the remaining outcome measures scores (BPI-interference, BDI-II, STAI and SF-12).

By the end of the study, PGI scores (Figure 3) didn't differ significantly between the two groups ($p=0.3152$), whereby 34% of patients in the GFD group reported an overall improvement as compared to 48% in the HCD. No change was reported by 27% and 14% of patients in the GFD group and HCD group, respectively. Only 3% of patients in the GFD group reported worsened global impression as compared to 7% in the HCD group. Both dietary interventions were highly tolerable and no adverse events were reported by any of the patients in both groups.

Discussion

The results of our current study demonstrated the absence of any significant differences between gluten-free and hypocaloric diets with respect to the change in the number of experienced gluten sensitivity symptoms (gastrointestinal and extraintestinal), fibromyalgia symptoms (including the impact and the severity of the disease), sleep problems, pain intensity, depression, anxiety, and quality of life when adopted by patients with fibromyalgia experiencing overlapping gluten sensitivity symptoms. Statistically significant drop in the total number of gluten sensitivity symptoms with respect to time ($p<0.0001$) was encountered in both groups. However, despite its specificity, GFD was not superior to HCD in reducing the number of these manifestations. These results do not support the presence of a relevant role for gluten sensitivity in the underlying pathophysiology of gastrointestinal symptoms in fibromyalgia.

The absence of specific biomarkers for the diagnosis of gluten sensitivity has advocated the utilization of "diagnosis by exclusion", in which gluten is excluded from the diet of the subject for a prespecified period of time, followed by a period of rechallenge while monitoring for symptomatologic changes [28]. Thus, evaluating the potential role of gluten sensitivity in fibromyalgia is possible only through the adoption of a GFD while closely monitoring and evaluating the progress of the study participants. Although the benefit of GFD has not been yet investigated in any randomized clinical trial in fibromyalgia, three clinical studies have been published with this dietary intervention.

In the first study, the adoption of GFD by seven patients with fibromyalgia diagnosed with comorbid celiac disease over a 12-month period led to significant clinical improvement not only in celiac symptoms but also in fibromyalgia symptoms (51-60% drop in tender points count, FIQ, pain and tiredness) and health-related quality of life [23]. In the second study that aimed to evaluate the effects of GFD in 97 patients diagnosed with fibromyalgia and IBS, clinically significant improve-

ment (tender points, FIQ, pain, fatigue, and GI symptoms) was seen only among those who were diagnosed with comorbid lymphocytic enteritis (LE), whereas patients presenting with normal intestinal mucosa didn't show any improvement [24]. In the third study, preliminary results of a case-series of selected patients with fibromyalgia and LE suggested an improvement after gluten elimination from the diet [12]. However, patients included in this study also received supplements of multivitamins and minerals in addition to placing some of them on a lactose-free diet. Therefore, it can be concluded that any possible contribution of gluten sensitivity to fibromyalgia symptomatology could be assumed on exceptional basis, whereby only patients with fibromyalgia pertaining specific clinical characteristics (such as celiac disease or LE) could benefit from a GFD.

An emerging hypothesis for the role of "non-celiac wheat sensitivity" (NCWS), a broader clinical entity than NCGS, is currently endorsed as being the possible explanation of the benefit experienced by those who eliminate gluten from their diet [8]. It has been postulated that the triggers of NCGS symptoms are not limited to the gliadin, non-gliadin parts of gluten or gluten contaminants but rather they might extend to include other wheat components such as amylase-trypsin inhibitors or fermentable oligo-, di-, mono-saccharides and polyols (FODMAPs) [14]. FODMAPs are encountered in a wide variety of food components such as fruits, vegetables and cereals, which points out to the fact that they are usually consumed in combination from various sources [7]. These observations along with the current findings of our study suggest a potential role of broader spectrum of sensitivities that extends beyond gluten to include FODMAPs as well. NCWS might constitute another conditional feature, besides celiac disease or LE, whose presence might define the subgroup of patients with fibromyalgia who could benefit from a GFD or FODMAPs-free diet. This reasoning encourages undertaking the adequate investigations to explore any possible role of these nutritional constituents in fibromyalgia using a randomized controlled study design.

As expected, a more significant drop in the BMI has been seen in the HCD group as compared to GFD group (-0.9 ± 1.4 vs. -0.7 ± 1.1 , respectively, $p = 0.0163$). It is noteworthy the drop in the BMI among patients placed on GFD. While there is no scientific evidence supporting weight control using GFD, it is known that adherence to GFD is linked to a dietary pattern that limits the intake of certain foods such as lower intake of carbohydrates, fibers and certain minerals [15]. On the other hand, it has been reported that there is a trend in replacing the gluten-derived carbohydrates in GFD with increased consumption of fats, proteins and hypercaloric beverages [39], which explains the hypercaloric content of GFD and the subsequent weight gain reported in several studies [9, 39]. In our study protocol, patients assigned to GFD intervention were informed of the absence of any caloric restriction for this diet and elimination of gluten, in its various forms, is the only governing regulation. However, the complexity of compliance to dietary interventions and the minimal ability to control the quantity of caloric consumption of those patients who were placed on GFD could have contributed for this drop in the average BMI.

With respect to the remaining secondary outcomes measures, it is evident that both dietary interventions were linked to a time-significant improvement in the FIQR, PSQI and BPI-severity scores. However, no differences were found between the two interventions. No beneficial effects were encountered with both interventions on pain interference, depression, anxiety and global health. Two clinical studies have also showed a significant benefit of adopting a hypocaloric diet by patients with fibromyalgia. In the first pilot non-randomized study, hypocaloric diet (1200-1500 cal/day) was effective in reducing pain, pain interference, and body dissatisfaction, as well as in improving quality of life [30]. In the second clinical study which was of randomized design, obese patients with fibromyalgia, who were randomly assigned to 6-month dietary weight loss group, experienced a more significant improvement in the FIQ, sleep quality, depression, quality of life and tender points count as compared to those who were assigned to the no weight loss group [29].

To our knowledge, the current pilot study is the first randomized controlled trial that evaluates the effects of a GFD on the gluten sensitivity symptoms among patients with fibromyalgia. However, our pilot study is not void of some limitations. The lack of any validated scale that evaluates the severity of these symptoms, both gastrointestinal and extraintestinal, constrained the authors to assemble a non-validated instrument represented in the clinical evaluation of a list of relevant symptoms and signs of gluten sensitivity. Furthermore, the lack of sample size calculation, due to the absence of previous data related to our primary outcome measure, is another limitation preventing us from controlling the power of the current study. Another limitation to the study is the lack of blinding, due to the dietary nature of the interventions adopted in our study which makes it unfeasible to implement blinding techniques.

Gastrointestinal symptoms are highly prevalent among patients with fibromyalgia. While the adoption of GFD in our study has been associated to beneficial outcomes in reducing gluten sensitivity related symptoms with respect to time only, the non-significant differences in these outcomes as compared to HCD indicate the lack of any specificity of this diet as previously hypothesized. The results of the current study along with the outcomes of other investigations support a beneficial role of GFD among a subgroup of patients with fibromyalgia whose specific clinical profile that determines their response to the dietary intervention are yet to be investigated.

References

1. Aparicio VA, Ortega FB, Heredia JM, Carbonell-Baeza A, Delgado-Fernández M. Analysis of the body composition of Spanish women with fibromyalgia. *Reumatol Clin* 2011;7(1):7-12.
2. Arnold LM, Clauw DJ, McCarberg BH, FibroCollaborative. Improving the recognition and diagnosis of fibromyalgia. *Mayo Clin Proc* 2011;86(5):457-64.

3. Arranz LI, Canela MÁ, Rafecas M. Dietary aspects in fibromyalgia patients: results of a survey on food awareness, allergies, and nutritional supplementation. *Rheumatol Int* 2012;32(9):2615-21.
4. Arranz LI, Canela MA, Rafecas M. Fibromyalgia and nutrition, what do we know? *Rheumatol Int* 2010;30(11):1417-27.
5. Badia X, Muriel C, Gracia A, Núñez-Olarte JM, Perulero N, Gálvez R, Carulla J, Cleeland CS; Grupo Vesbpi. Validation of the Spanish version of the Brief Pain Inventory in patients with oncological pain. *Med Clin (Barc)* 2003;120:52-9.
6. Berstad A, Undseth R, Lind R, Valeur J. Functional bowel symptoms, fibromyalgia and fatigue: a food-induced triad? *Scand J Gastroenterol* 2012;47:914-9.
7. Biesiekierski JR, Muir JG, Gibson PR. Is gluten a cause of gastrointestinal symptoms in people without celiac disease? *Curr Allergy Asthma Rep* 2013;13(6):631-8.
8. Carroccio A, Mansueto P, Iacono G, Soresi M, D'Alcamo A, Cavataio F, Brusca I, Florena AM, Ambrosiano G, Seidita A, Pirrone G, Rini GB. Non-celiac wheat sensitivity diagnosed by double-blind placebo-controlled challenge: exploring a new clinical entity. *Am J Gastroenterol* 2012;107(12):1898-906.
9. Dickey W, Kearney N. Overweight in celiac disease: prevalence, clinical characteristics, and effect of a gluten-free diet. *Am J Gastroenterol* 2006;101(10):2356-9.
10. García-Leiva JM, Ordóñez Carrasco JL, Slim M, Calandre EP. Celiac symptoms in patients with fibromyalgia: a cross-sectional study. *Rheumatol Int* 2014 [Epub ahead of print].
11. Haugen M, Kjeldsen-Kragh J, Nordvåg BY, Førre O. Diet and disease symptoms in rheumatic diseases--results of a questionnaire based survey. *Clin Rheumatol* 1991;10(4):401-7.
12. Isasi C, Colmenero I, Casco F, Tejerina E, Fernandez N, Serrano-Vela JL, Castro MJ, Villa LF. Fibromyalgia and non-celiac gluten sensitivity: a description with remission of fibromyalgia. *Rheumatol Int* 2014;34(11):1607-12.
13. Kurland JE, Coyle WJ, Winkler A, Zable E. Prevalence of irritable bowel syndrome and depression in fibromyalgia. *Dig Dis Sci* 2006;51(3):454-60.
14. Mansueto P, Seidita A, D'Alcamo A, Carroccio A. Non-celiac gluten sensitivity: literature review. *J Am Coll Nutr* 2014;33(1):39-54.
15. Marcason W. Is there evidence to support the claim that a gluten-free diet should be used for weight loss? *J Am Diet Assoc* 2011;111(11):1786.
16. Nelsen DA Jr. Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease): more common than you think. *Am Fam Physician* 2002;66(12):2259-66.
17. Neumann L, Lerner E, Glazer Y, Bolotin A, Shefer A, Buskila D. A cross-sectional study of the relationship between body mass index and clinical characteristics, tenderness measures, quality of life, and physical functioning in fibromyalgia patients. *Clin Rheumatol* 2008;27(1):1543-7.
18. Okifuji A, Donaldson GW, Barck L, Fine PG. Relationship between fibromyalgia and obesity in pain, function, mood, and sleep. *J Pain* 2010;11(12):1329-37.
19. Pamuk ON, Umit H, Harmandar O. Increased frequency of gastrointestinal symptoms in patients with fibromyalgia and associated factors: a comparative study. *J Rheumatol* 2009;36(8):1720-4.

20. Puccio FA, Rojas R, Mosquera I, Hernandez A, Mosquera R, Jaua L, Lizarralde M, Ci-farelli D, Reyes R. Food allergy is an important diseases associated to fibromyalgia [abstract]. *Clin Transl Allergy* 2013;3(Suppl 3):120.
21. Pulido O, Zarkadas M, Dubios S, Macisaac K, Cantin I, La Vieille S, Godefroy S, Rashid M. Clinical features and symptom recovery on a gluten-free diet in Canadian adults with celiac disease. *Can J Gastroenterol* 2013;27(8):449-53.
22. Queiroz LP. Worldwide epidemiology of fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep* 2013;17(8):356.
23. Rodrigo L, Blanco I, Bobes J, de Serres FJ. Clinical impact of a gluten-free diet on health-related quality of life in seven fibromyalgia syndrome patients with associated celiac disease. *BMC Gastroenterol* 2013;13:157.
24. Rodrigo L, Blanco I, Bobes J, de Serres FJ. Effect of one year of a gluten-free diet on the clinical evolution of irritable bowel syndrome plus fibromyalgia in patients with associated lymphocytic enteritis: a case-control study. *Arthritis Res Ther* 2014;16(5):421.
25. Royuela A, Macías JA. Propiedades clinimétricas de la versión castellana del cuestionario de Pittsburgh. *Vigilia-sueño* 1997;9:81-94.
26. Salgueiro M, García-Leiva JM, Ballesteros J, Hidalgo J, Molina R, Calandre EP. Validation of a Spanish version of the Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQR). *Health Qual Life Outcomes* 2013;11:132.
27. Sanz J, Perdigón AL, Vázquez C. Adaptación española del inventario para la depresión de Beck-II. Propiedades psicométricas en la población general. *Clínica y Salud* 2003;14:249-80.
28. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med* 2012;10:13.
29. Senna MK, Sallam RA, Ashour HS, Elarman M. Effect of weight reduction on the quality of life in obese patients with fibromyalgia syndrome: a randomized controlled trial. *Clin Rheumatol* 2012;31(11):1591-7.
30. Shapiro JR, Anderson DA, Danoff-Burg S. A pilot study of the effects of behavioral weight loss treatment on fibromyalgia symptoms. *J Psychosom Res* 2005;59(5):275-82.
31. Slim M, Calandre EP, Rico-Villademoros F. An insight into the gastrointestinal component of fibromyalgia: clinical manifestations and potential underlying mechanisms. *Rheumatol Int* 2014 [Epub ahead of print].
32. Slotkoff AT, Radulovic DA, Clauw DJ. The relationship between fibromyalgia and the multiple chemical sensitivity syndrome. *Scand J Rheumatol* 1997;26(5):364-7.
33. Smith HS, Harris R, Clauw D. Fibromyalgia: an afferent processing disorder leading to a complex pain generalized syndrome. *Pain Physician* 2011;14(2):E217-45.
34. Smythe HA, Moldofsky H. Two contributions to understanding of the "fibrositis" syndrome. *Bull Rheum Dis* 1977-1978;28(1):928-31.
35. Smythe HA. Non-articular rheumatism and the fibrositis syndrome. In L. Hollander (Ed.), *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology* (8th ed., pp. 874-884). Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1972.

36. Sperber AD, Atzmon Y, Neumann L, Weisberg I, Shalit Y, Abu-Shakrah M, Fich A, Buskila D. Fibromyalgia in the irritable bowel syndrome: studies of prevalence and clinical implications. *Am J Gastroenterol* 1999;94(12):3541-6.
37. Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene RE. STAI. Cuestionario de Ansiedad Estado-Rasgo. Manual (6ª edición). In Publicaciones de Psicología Aplicada. Serie menor número 124. Madrid: TEA Ediciones; 2002.
38. Triadafilopoulos G, Simms RW, Goldenberg DL. Bowel dysfunction in fibromyalgia syndrome. *Dig Dis Sci* 1991;36(1):59-64.
39. Valletta E, Fornaro M, Cipolli M, Conte S, Bissolo F, Danchielli C. Celiac disease and obesity: need for nutritional follow-up after diagnosis. *Eur J Clin Nutr* 2010;64(11):1371-2.
40. Veale D, Kavanagh G, Fielding JF, Fitzgerald O. Primary fibromyalgia and the irritable bowel syndrome: different expressions of a common pathogenetic process. *Br J Rheumatol* 1991;30(3):220-2.
41. Vilagut G, Valderas JM, Ferrer M, Garin O, López-García E, Alonso J: Interpretation of SF-36 and SF-12 questionnaires in Spain: physical and mental components. *Med Clin (Barc)* 2008;19:726-35.
42. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Häuser W, Katz RS, Mease P, Russell AS, Russell IJ, Winfield JB. Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. *J Rheumatol.* 2011;38(6):1113-22.
43. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, Russell AS, Russell IJ, Winfield JB, Yunus MB. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010;62(5):600-10.
44. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia. Report of the multicenter criteria committee. *Arthritis Rheum* 1990; 33(2):160-72.
45. Yunus M, Masi AT, Calabro JJ, Miller KA, Feigenbaum SL. Primary fibromyalgia (fibrositis): clinical study of 50 patients with matched normal controls. *Semin Arthritis Rheum* 1981;11(1):151-71.
46. Yunus MB, Arslan S, Aldag JC. Relationship between body mass index and fibromyalgia features. *Scand J Rheumatol* 2002;31(1):27-31.



Analysis of the questionnaires LANSS, DN4 and brief pain inventory (BPI) in the detection and evaluation of peripheral neuropathic pain

Hamdan A, Luna JD, Gálvez R, del Pozo E

Abstract

Aims: To compare the diagnostic accuracy of the LANSS and the DN4 questionnaires for the detection and evaluation of peripheral neuropathic pain in the Spanish population, to analyze in detail the diagnostic quality of each item in these questionnaires and to determine variables of type, socio-demographic, clinical, pharmacologic and neuropathic pain diagnosis that can be associated with pain intensity and interference with the activities of daily living, both assessed using the brief pain inventory (BPI).

Methods: A total of 192 patients ($n = 121$ with peripheral neuropathic pain and $n = 71$ with nociceptive pain) were enrolled. We compared the validity of the DN4 and LANSS questionnaires by studying sensitivity and specificity and using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. We also analyzed the validity of each item in the questionnaires. We compared pain intensity and pain interference in daily activities among groups of pain. Also, we performed different association and prediction analysis to determine the factors that may affect the intensity of pain and quality of life and to evaluate possible associations between neuropathic pain descriptors with different items of the (BPI).

Results: The estimated area under the ROC curve (95% CI) was 0.989 (0.977-1) for the DN4 questionnaire and 0.973 (0.956-0.991) for the LANSS questionnaire. The area under the ROC curve was significantly larger for the DN4 than the LANSS questionnaire ($p < 0.05$). Analyses of specific items showed that tingling and numbness in the DN4 tool, and light touch pain and altered pinprick threshold in the LANSS scale, were the most important features of neuropathic pain. The LANSS score was positively associated ($p < 0.05$) with the intensity of pain in BPI, being the LANSS items «light touch pain» and «altered pinprick threshold» strong predictors ($p < 0.05$). Although DN4 score does not predict the intensity of pain, the items «painful cold» and «itching» were positively associated ($p < 0.05$) with several items of pain intensity dimension in BPI. In BPI questionnaire, the different items for measuring the interference in daily activity were strongly associated with pain

intensity average (BPI), but not with LANSS or DN4 scores, neither with specific items in these questionnaires

Conclusions: The DN4 questionnaire is especially recommended for the identification of patients with peripheral neuropathic pain component in clinical practice, while the LANSS questionnaire also provides information on the intensity. In the other hand, it is the pain intensity, rather than the characteristics of the same, which predicts the interference with activities of daily living.

Introduction

Despite the high incidence of neuropathic pain in clinical practice (1–7), especially the mixed pain, where neuropathic pain is associated with nociceptive, the complexity of neuropathic pain, and the circumstances surrounding it make its diagnosis often wrong and late, so that the successful treatment still remains distant in many cases, to the point where obtained relief rarely exceeds 60% in properly treated cases (8). Therefore, it is important to diagnose and properly treat neuropathic pain, because this entity requires a different analgesic treatment (9–17).

Until recently, the pain has been evaluated in its intensity and other accompanying phenomena with general pain questionnaires, which do not allow a clear distinction between nociceptive and neuropathic pain, so there is a need to develop and use specific questionnaires for neuropathic pain (18). There are few validated scales to Spanish language for the detection of neuropathic pain. The first was the LANSS questionnaire (19), and then the DN4 (20), a recent neuropathic pain scale of great use by most authors. Although these assessment tools have been compared in other languages and countries (21,22), no studies of that kind have been done in Spain, therefore, comparative studies of different neuropathic pain questionnaires validated to Spanish are needed, to determine whether they are interchangeable in clinical practice and / or what degree of validity dose the different scales provide. Also, we do not have information about studies that measure the diagnostic accuracy of each item in the questionnaires.

Traditionally most therapeutic trials in patients with chronic pain have focused on the evaluation of pain reduction (23). Also it is recommended to assess the presence of sleep disorders, functional capacity and quality of life in general (24). Several generic questionnaires were designed to measure the quality of life related to health of patients with chronic diseases that have been validated for patients with pain, and allow comparison with a reference population and other patient groups (25).

In clinical practice, it is recommended to evaluate the quality of life of patients with pain with an overall scale validated to Spanish, being of choice the SF-36 (MOS 36-item short-form health survey) (26), the NHP (Nottingham Health Profile) (27) and brief pain (BPI, the brief Pain inventory) (28). It is recommended

that if the scales do not include mood, sleep or functional capacity, they should be evaluated separately (24,29).

The Spanish adaptation of the (BPI) questionnaire has proved to be a valid version for use in clinical practice, keeping the dimensions of original version (28,30,31). It is a simple, brief and includes the above questions. In this work, **the analysis of the Spanish validation of this version** (28) included only the items of the dimensions 'pain intensity' and 'interference in the activities of daily life'. The full questionnaire administration, yields more accurate information about the characteristics of pain; however, when the goal is to get a faster and accurate assessment of the intensity of pain and its impact on activities of daily living for subsequent comparison of groups or assessment of changes in patients, is sufficient to administer the 11 items that constitute the two dimensions (28).

Although the brief pain has been used in patients with diabetic neuropathic pain (32), no studies have been conducted to analyze the impact of socio-demographic and pharmacological and clinical variables with the two dimensions of the questionnaire BPI above referred in patients with neuropathic pain in the Spanish population. Special attention is needed in studying whether the existence of neuropathic pain, detected by clinical diagnosis by specialists or after examination of the scores obtained with neuropathic pain questionnaires; DN4 or LANSS is associated with variables averages obtained after administration of BPI questionnaire. This will yield information on whether LANSS and DN4 scale and besides facilitating the detection of neuropathic pain, also can assess the degree of pain and distortion produced in daily activities.

MAIN OBJECTIVES

- To compare the diagnostic accuracy of LANSS and DN4 questionnaire for the detection and evaluation of peripheral neuropathic pain in the Spanish population.
- To analyze in details the diagnostic quality of the different items of the questionnaires DN4 and LANSS.
- Determine variables of type of, socio-demographic, clinical, pharmacologic and neuropathic pain diagnosis that can be associated with pain intensity and interference of pain with the activities of daily life, both assessed using the Brief pain inventory (BPI).

SECONDARY OBJECTIVES

- To evaluate the characteristics and intensity of pain and quality of life of patients with chronic peripheral pain through LANSS, DN4 and BPI questionnaires.

- To analyze the possible association between the descriptors of neuropathic pain in LANSS and DN4 questionnaire with items of brief pain (BPI).

Patients and methods

Type of study: Epidemiological, cross-sectional and observational study. A notebook for data collection to record information of the different variables and the questionnaires LANSS, DN4 and brief pain (BPI) was developed. A total of 192 consecutive patients ($n = 121$ with peripheral neuropathic pain, and $n = 71$ with nociceptive pain) were seen in the Pain Units at the Reina Sofía Hospital (Córdoba) and the Virgen de las Nieves Hospital (Granada), between April 2012 and April 2013. For statistical analysis, Stata 11.5 was used. An initial descriptive analysis of frequency distribution was done for the main studied variables.

To carry out comparisons between groups of pain (neuropathic and nociceptive) with each of the variables, (neuropathic pain, descriptors existing in the DN4 and questionnaire LANSS and also to the characteristics of daily life), two separate analyzes were performed: when the variable was numeric, a mean comparison test with the *t* Student test was conducted, when the variable was categorical, analysis of the corresponding contingency table using the chi square test was carried out and if their conditions were not met, Fisher's test was used.

The validity of DN4 and LANSS questionnaires was compared by analyzing sensitivity and specificity and using a receiver operating characteristic (ROC). The validity of each item of the questionnaire was also analyzed. Furthermore pain intensity and pain interference in daily activities among pain groups was compared. In addition, different association and prediction analysis were done to determine the factors that may affect the intensity of pain and quality of life and to evaluate possible associations between the descriptors of neuropathic pain with different items of (BPI).

Results

A total of 192 patients were recruited. There was 39 patients (20.31%) with pure neuropathic pain, 71 (36.98%) with nociceptive pain and 82 (42%) with mixed pain. Most patients (121, 63.02%) had a neuropathic pain component. For purposes of comparison, the patients were grouped into those with pain associated with a neuropathic component (NP group) and patients with non-neuropathic pain (NNP group).

The demographic and clinical features of the participants are shown in Table 1. There were no differences in sex, height, weight, body mass index or type of appointment. Patients in the NNP group were older ($p < 0.001$) and their pain has lasted longer ($p < 0.001$) than in the NP group. Educational level was significantly

associated with neuropathic pain ($p = 0.012$). Patients with neuropathic pain had higher VAS scores than those with non-neuropathic pain ($p = 0.018$).

TABLE 1. Demographic, baseline and clinical characteristics in patients with neuropathic (NP) and non-neuropathic pain (NNP).

	NP (n = 121)	NNP (n = 71)	p-value
Age (years)	58.9±1.2 ^a	69.3±1.3 ^a	<0.001
Sex, female/male, n (%)	82/39 (67.8/32.2)	52/19 (73.2/26.8)	0.425
Height (cm)	163.7±0.6 ^a	161.4±1 ^a	0.067
Weight (kg)	75.9±1.3 ^a	75.7±1.7 ^a	0.926
BMI (kg/m ²)	28.4±0.5 ^a	29.1±0.6 ^a	0.444
Educational level, n (%)			0.012
None or elementary studies	26 (21.5)	29 (40.9)	
Primary education	50 (41.3)	29 (40.9)	
Secondary education	22 (18.2)	6 (8.5)	
Vocational training	14 (11.6)	2 (2.8)	
Higher education	9 (7.4)	5 (7)	
Type of appointment, n (%)			0.613
First	35 (28.9)	23 (32.4)	
Follow-up	86 (71.1)	48 (67.6)	
Duration of pain symptoms (months)	65.9±8.2 ^a	121.5±15.8 ^a	0.001
VAS (cm)	6.44±0.14 ^a	5.87±0.19 ^a	0.018

BMI, body mass index; NNP, non-neuropathic pain; NP, neuropathic component pain; VAS, visual analogue scale (0–10 cm). a, Data are expressed as the mean ± standard error of the mean.

The etiology of pain is summarized in Table 2, all patients with pain from radiculopathies, neuralgia, neuropathies, type II CRPS, carpal tunnel syndrome, plexopathies and deafferentation were diagnosed as having a neuropathic pain component. Analysis showed that neuropathic pain was significantly associated with radiculopathies, neuralgias ($p < 0.001$) and neuropathies ($p < 0.05$), whereas there

TABLE 2. *Etiology of pain in patients with neuropathic (NP) and non-neuropathic pain (NNP)*

Etiology, n (%)	NP (n = 121)	NNP (n = 71)	p-value
Radiculopathies	67 (55.4)	0	<0.001
Neuralgia*	19 (15.7)	0	<0.001
Post surgical pain	16 (13.2)	5 (7)	0.185
Neuropathies	7 (5.8)	0	0.039
CRPS II	6 (5)	0	0.057
Carpal tunnel syndrome	2 (1.7)	0	0.276
Plexopathies	1 (0.8)	0	0.442
Deafferentation pain	1 (0.8)	0	0.442
Neoplasia**	1 (0.8)	1 (1.4)	0.701
Arthritis	1	2 (2.8)	0.283
Osteoporosis and mechanical pain	0	8 (11.3)	<0.001
Osteoarthritis	0	55 (77.5)	<0.001

Frequencies for etiology are presented as n and the percentage (%) calculated for the total number of patients in each group of neuropathic component pain (NP) or non-neuropathic pain (NNP).

CRPS II, Complex regional pain syndrome type II

* Includes post-herpetic (n=9), trigeminal (n=6) and others (occipital, crural, pudendal) (n=4)

** Includes a case of neoplastic plexopathy in a patient with multiple myeloma (NP group) and pelvic metastases secondary to prostate tumor (NNP group).

were no significant associations with any of the other etiologies, perhaps because of the small numbers of patients with each of these pathologies. Patients who experienced pain from degenerative osteoarthritis or osteoporosis were all diagnosed as having nociceptive (non-neuropathic) pain. Analysis showed an inverse relationship between neuropathic pain and these two etiologies ($p < 0.001$).

FREQUENCIES OF POSITIVE RESPONSES ON THE DN4 AND LANSS QUESTIONNAIRES

The frequencies of positive responses to each item in the LANSS and DN4 questionnaires were compared between the NP and NNP groups (Table. 3). Positive responses were significantly more frequent ($p < 0.001$) in the NP group than the NNP group.

TABLE 3. Frequency of positive items in patients with neuropathic and non-neuropathic pain

Etiology, n (%)	NP (n = 121)	NNP (n = 71)	p-value
LANSS items, n (%)			
1. Pricking, tingling, pins and needles	118 (97.52)	36 (50.70)	<0.001
2. Skin discoloration	29 (23.97)	0	<0.001
3. Light touch pain	92 (76.03)	7 (9.86)	<0.001
4. Electric shocks, jumping, bursting	86 (71.07)	28 (39.44)	<0.001
5. Feeling of altered skin temperature	98 (80.99)	31 (43.66)	<0.001
7. Altered pinprick threshold	111 (91.74)	18 (25.35)	<0.001
DN4 items, n (%)			
1. Burning	89 (73.55)	22 (30.99)	<0.001
2. Painful cold	21 (17.36)	2 (2.82)	0.003
3. Electric shocks	68 (56.20)	14 (19.72)	<0.001
4. Tingling	90 (74.38)	2 (2.82)	<0.001
5. Pins and needles	83 (68.60)	23 (32.39)	<0.001
6. Numbness	89 (73.55)	7 (9.86)	<0.001
7. Itching	54 (44.63)	6 (8.45)	<0.001
8. Touch hypoesthesia	53 (43.80)	5 (7.04)	<0.001
9. Pinprick hypoesthesia	53 (43.80)	6 (8.45)	<0.001
10. Brushing	57 (47.68)	9 (12.68)	<0.001

Frequencies are presented as n and the percentage (%) calculated upon total patients in each group of neuropathic component pain (NP) or non neuropathic pain (NNP).

COMPARISON OF THE VALIDITY OF THE DN4 AND LANSS QUESTIONNAIRES

In the LANSS questionnaire, the mean score ($\pm$ SEM) for patients with NP was 15.7 ± 0.41 , with a range from 5 to 24, whereas in patients with NNP the mean score was 5.3 ± 0.39 , with a range from 0 to 11. In the DN4 questionnaire, the mean score ($\pm$ SEM) for patients with NP was 5.5 ± 0.13 with a range from 1 to 9, whereas in patients with non-neuropathic pain the mean score was 1.4 ± 0.12 with a range of 0 to 4. Overall, the mean score on both the LANSS and DN4 questionnaires was significantly higher in patients with neuropathic pain compared to the NNP group ($p < 0.001$).

In the group of patients with neuropathic pain, a cut-off value ≥ 12 to diagnose neuropathic pain with the LANSS pain scale had a sensitivity of 80.2% and a specificity of 100%. A cut-off point value ≥ 4 in the DN4 questionnaire yielded a sensitivity of 95% and a specificity of 97.2% (see the confidence intervals in Table 4. These results indicate a good relationship between the clinical diagnosis and scores on the LANSS and DN4 questionnaires with their accepted cut-off values of ≥ 12 and ≥ 4 , respectively.

TABLE 4. Comparison of the validity of the LANSS and DN4 questionnaires in patients with peripheral neuropathic pain.

	LANSS (score ≥ 12)	DN4 (score ≥ 4)	p-value
Sensitivity, % (95% CI)	80.17 (71.9–86.9)	95.04 (89.5–98.2)	—
Specificity, % (95% CI)	100 (94.9–100)	97.18 (90.2–99.7)	—
AUC (CI 95%)	0.973 (0.956–0.991)	0.989 (0.977–1.00)	0.048a

AUC, area under the curve (ROC analysis); CI, confidence interval; DN4, Douleur Neuropathique en 4 questions; LANSS, Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs. a Delong's test.

The estimated area under the ROC curves (95% CI) was 0.973 (0.956–0.991) for the LANSS pain scale and 0.989 (0.977–1), for the DN4 questionnaire (Fig. 1). The AUC for the DN4 questionnaire was significantly greater than for the LANSS tool ($p < 0.05$). Youden's index was 0.80 for the LANSS tool and 0.92, for the DN4 questionnaire.

Mean administration time ($\pm$ SEM) was 2.5 ± 0.08 min for the DN4 tool and 5.3 ± 0.11 min for the LANSS pain scale.

DIAGNOSTIC QUALITY OF EACH ITEM IN THE SPANISH VERSION OF LANSS AND DN4 QUESTIONNAIRES

The diagnostic quality of each item in the LANSS pain scale (cut-off value ≥ 12) and DN4 questionnaire (cut-off value ≥ 4) was analyzed for the differential diagnosis of neuropathic pain vs. non-neuropathic pain. In each questionnaire we compared the sensitivity and specificity as the area under the ROC curve for each item. On the basis of the variability we observed, we grouped the items into three diagnostic quality categories: high, intermediate and low.

For the LANSS scale (Fig. 2), the first group (high diagnostic quality) contained the items 3 «light touch pain» and 7 «altered pinprick threshold», for which the area under the ROC curve was significantly larger ($p < 0.05$) than for the other items (item 3, 0.831; item 7, 0.832). The second group (intermediate diagnostic quality)

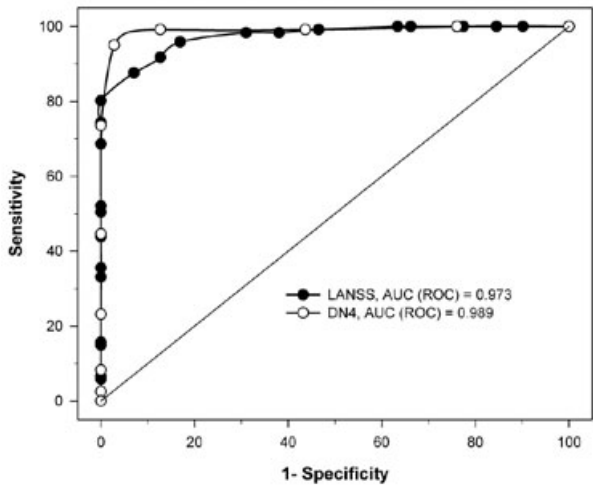


FIGURE 1. Receiver operating characteristic (ROC) curves and area under the ROC curve (AUC) values for the Spanish version of the Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs (LANSS) and Douleur Neuropathique en 4 questions (DN4) questionnaires for the differential diagnosis of peripheral neuropathic versus non-neuropathic pain.

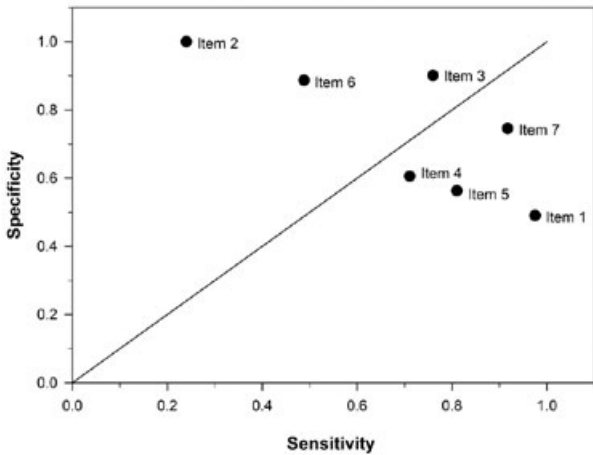


FIGURE 2. Analysis of the validity of each item in the Spanish version of the Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs (LANSS) pain scale based on a cut-off value of ≥ 12 . The specificity for each item was plotted against its sensitivity. LANSS items: item 1, pricking, tingling, pins and needles; item 2, skin discoloration; item 3, light touch pain; item 4, electric shocks, jumping, bursting; item 5, burning, hot; item 6, allodynia; item 7, altered pinprick threshold.

contained items 1 «pricking/tingling/pins and needles», 4 «electric shocks, jumping, bursting», 5 «burning, hot» and 6 «allodynia», for which the area under the ROC curve was significantly smaller ($p < 0.05$) than for the first group but greater ($p < 0.05$) than for the third group (item 1, 0.734; item 4, 0.658; item 5, 0.687; and item 6, 0.687). The third group (low diagnostic quality) contained item 2 «skin discoloration», for which the area was significantly smaller ($p < 0.05$) than for the intermediate group (0.620).

In the DN4 questionnaire (Fig. 3) the first group (high diagnostic quality) contained items 4 «tingling» and 6 «numbness», with an area under the ROC curve significantly greater ($p < 0.05$) than the area for the remaining items (item 4, 0.858; item 6, 0.818). The intermediate diagnostic quality group contained items 1 «burning», 3 «electric shocks», 5 «pins and needles», 7 «itching», 8 «touch hypoesthesia», 9 «pinprick hypoesthesia» and 10 «brushing». The area under the ROC curve for these items was significantly smaller ($p < 0.05$) than for the first group and significantly greater than for the third group (item 1, 0.713; item 3, 0.682; item 5, 0.681; item 7, 0.681; item 8, 0.684; item 9, 0.677; item 10, 0.672). The low diagnostic quality group contained item 2, with an area under the ROC curve significantly smaller ($p < 0.05$) than that of all other items (0.573).

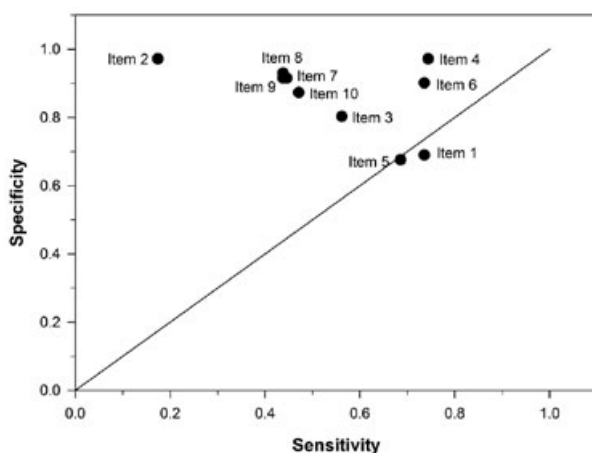


FIGURE 3. Analysis of the validity of each item in the Spanish version of the Douleur Neuropathique en 4 questions (DN4) questionnaire based on a cut-off value of ≥ 4 . The specificity for each item was plotted against its sensitivity. DN4 items: item1, burning; item 2, painful cold; item 3, electric shocks; item 4, tingling; item 5, pins and needles; item 6, numbness; item 7, itching; item 8, hypoesthesia to touch; item 9, hypoesthesia to prick; item 10, pain caused or increased by brushing.

In the population we studied, pain intensity was greater in patients with a neuropathic component than in those with non-neuropathic pain, which agrees with data reported by other authors (Unal-Cevik, 2010; Harifi et al., 2011). On the other hand, the duration of pain was longer in the NNP group than the NP group, which agrees with findings reported by Harifi et al. (2010) but not with the results published by Bouhassira et al. (2005). Non-neuropathic pain is due, in most cases, to processes of osteoarthritis and osteoporosis, which are long-lasting. This factor, together with the advanced age of the patients, may explain the longer duration of chronic pain in the NNP group.

The sensitivity (95.04) and specificity (97.18) we found for the DN4 questionnaire are close to the figure reported in previous studies (Santos et al., 2010; Unal-Cevik et al., 2010) but are higher than those reported by others (Bouhassira et al., 2005; Perez et al., 2007; Spallone et al., 2012). Regarding the LANSS scale, sensitivity (80.17%) was within the range of previously reported values (Bennet, 2001; Yucel et al., 2004; Perez et al., 2006), and specificity was very high, at 100%. Differences in study populations and in the classification of neuropathic pain may explain the variability among different studies. Moreover, the diagnosis in the patients included in the present study was made by medical specialists affiliated with pain clinics, based on their clinical judgment, prior tests or imaging studies; thus the quality of the clinical diagnosis of neuropathic pain would be expected to be high. In our comparison of the validity of the DN4 and LANSS tools, we found that although both are highly discriminative, the predictive ability of the DN4 questionnaire was better, because the AUC in ROC analysis was significantly larger ($p < 0.05$) than the area obtained for the LANSS scale.

Regarding the analysis of the sensitivity and specificity of each item in both tools, we found differences that merit attention. In the DN4 questionnaire, the items with the highest diagnostic quality were numbness (item 6) and tingling (item 4), which agrees with the findings of Unal-Cevik et al. (2010) and Santos et al. (2010). However, in the LANSS scale, tingling, which is listed along with other descriptors in the same item (item 1), had an intermediate level of diagnostic quality. A provisional conclusion that can be drawn from this finding is that it is preferable to use simple descriptors rather than complex ones. In contrast, the items with the lowest diagnostic quality in the present study were skin discoloration (item 2, LANSS) and painful cold (item 2, DN4). Among the different descriptors of physical signs that both questionnaires use, altered pinprick threshold in the LANSS scale showed the best diagnostic quality, which was even better than allodynia despite the fact that a positive response for allodynia (item 6, 5 points) is scored more highly than a positive response for altered pinprick threshold (item 7, 3 points).

Internal consistency of the Brief Pain Questionnaire (BIS-11 items) was good, according to figures obtained Cronbach's alpha (33), and this was verified in both the total sample and for subgroups of neuropathic pain and nociceptive pain.

The intensity of pain for neuropathic pain group was higher than nociceptive pain group and recorded an average similar to that obtained with the visual ana-

log scale in this study. Mean pain interference with daily activities was also higher for the group of neuropathic pain and recorded an average close to the intensity of pain. (Fig. 4 and Fig. 6).

Regarding the classification of pain, the three categories were remained: no pain or mild pain (0-3), moderate (4-6) and severe (≥ 7), (28,30,32,34). In this study, patients who did not experience pain during the last week were excluded. Moreover, the present study shows different degrees of pain intensity between groups of patients, that in nociceptive dominate mild and moderate intensities, whereas in neuropathic pain predominates the severe pain. (Fig. 5).

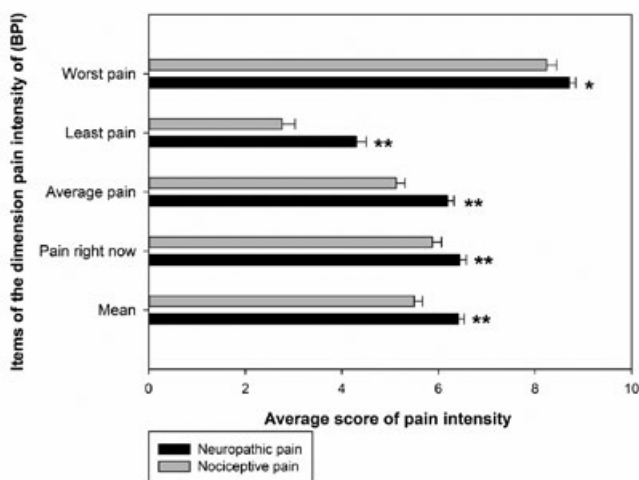


FIGURE 4. Intensity of pain assessed by the Brief Pain inventory (BPI) for groups of nociceptive pain and neuropathic pain. average values $\pm$ the standard error of The mean (SEM) of scores of the different items of the questionnaire BPI are shown.

Statistically significant differences: Student t test for independent samples and Bonferroni test, * $p \leq 0.05$; ** $P \leq 0.001$

It is considered that the pain interferes substantially with one or more daily activities when the patient responds giving a score of ≥ 5 . For the total sample, the descending order of daily activities affected according to the percentage of patients was as follows: usual work, general activity, enjoying life, walking ability, mood, sleep and the ability to interact with others. For the groups of pain, it is shown that, in general, patients with neuropathic pain were more affected in their daily activities, although the difference was not very high.

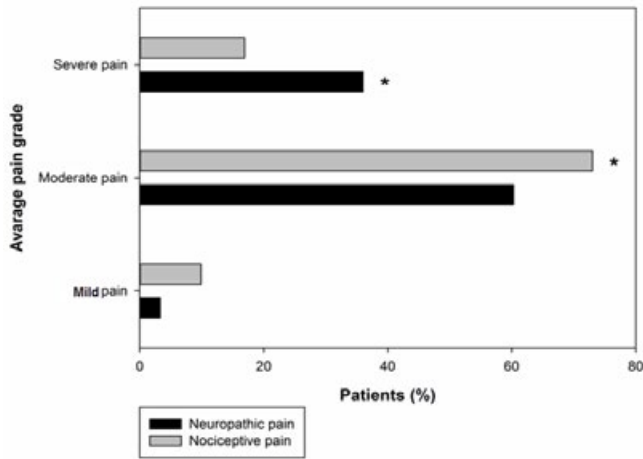


FIGURE 5. Average pain Grades for neuropathic and nociceptive pain groups.
Statistically significant differences: * $p \leq 0.05$, chi-square test of Pearson.

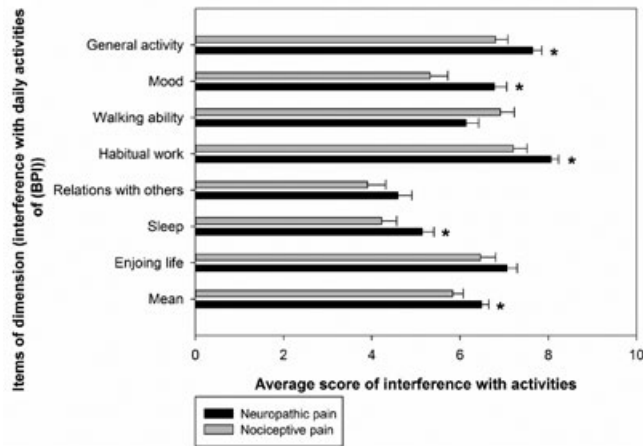


FIGURE 6. Interference of pain with different daily activities, as assessed by the Brief Pain Questionnaire (BPI). The mean ($\pm$ SEM) of the scores on the different items of the questionnaire, in its dimension of «pain interference with daily activities», for groups of nociceptive pain and neuropathic pain component is shown.
Statistically significant differences between groups: * $p \leq 0.05$, Student's t test for independent samples and the Bonferroni test.

The interference with sleep was significantly higher in the group of neuropathic pain, while the effect on the walking ability is significantly higher in the group of nociceptive pain. (Fig. 7)

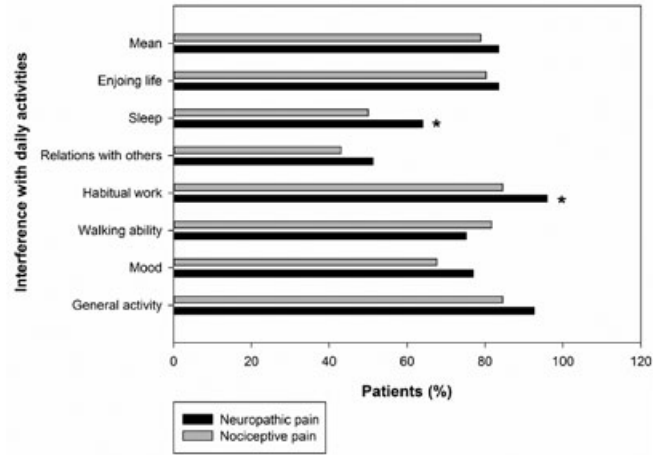


FIGURE 7. Distribution of patients according to affirmation in substantial interference with daily activities for groups of nociceptive pain and neuropathic pain component.

Statistically significant differences: * $p \leq 0.05$, chi-square test of Pearson.

In this work, association analysis for the different items of the brief pain (BPI) was also performed, (Table. 5). The results of this section can be summarized, saying that pain intensity represented by the BPI questionnaire items (worst, least and average) is clearly associated to the LANSS questionnaire score. It also shows that the clinical diagnosis of neuropathic pain is associated with least and average pain intensity. Also a positive association between the clinical diagnosis of neuropathic pain with the items of pain intensity BPI (least and average pain in the last week was shown.

In the contrary to what was observed in the LANSS questionnaire, DN4 does not show a significant association in the adjusted models, however, the two questionnaires share most of the descriptors of neuropathic pain, and it would make sense that the DN4, behave equally or similarly to LANSS. In fact in the bivariate analysis, a behavior similar to LANSS shown, and were significantly associated with most of the items of (BPI). This can probably suggest that this behavior is due to the structure of the DN4 or the score of each item.

TABLE 5. Association relation between the predictor variables «Neuropathic component», «score on the questionnaire LANSS» and «score on the DN4 questionnaire» with each item dimension of pain intensity of brief pain (BPI), according to the respective multivariate models. The respective models adjusted for all predictor variables, including the type of drugs.

	Worst pain	Least pain	Avarage pain	Pain in session	Mean
Neuropathic component	0,05< p≤ 0,10	p < 0,01	p < 0,01	p > 0,10	p < 0,01
LANSS score	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,001
DN4 score	p > 0,10	0,05 < p≤ 0,10	0,05 < p≤ 0,10	p > 0,10	0,05 < p≤ 0,10

For the second dimension (pain interference with daily activities) of (BPI), in this part of the regression analysis, (Table. 6), we seek the possible association with the average pain intensity during the last week estimated by the patient (item 3 of the dimension of pain intensity (BPI)). It was found that the strongest predictor of the different items of quality of life is the average intensity of pain, rather than its quality, since no relation to the «pain diagnosis variables: neuropathic component, the LANSS questionnaire score and nor the DN4 questionnaire score was shown.

TABLE 6. Association relation between the predictor variables «average pain intensity (BPI)», «pain with a neuropathic component», «score on the questionnaire LANSS» and «score on the DN4 questionnaire» with each item of the dimension «interference in the activities of daily living of brief pain questionnaire (BPI)», «according to the respective multivariate models. The respective models are adjusted for all predictor variables, including the type of drugs.

	General activity	Mood	Walking ability	Habitual work	Relations with others	Sleep	Enjoying life	mean
Avarage pain (Item 3 of BPI)	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001
Neuropathic component	p > 0,10	p > 0,10	0,05 < p≤ 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10
LANSS score	p = 0,053	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10
DN4 score	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10

Regarding the results of the prediction analysis of pain intensity (four items and an overall mean) by the various items of LANSS and DN4 questionnaire, (Table. 7), it can be summarized (considering the significant associations at the classical level ($p < 0,05$)), in general and positively, that among the items of LANSS the item1 (stinging, pricking or tingling) predicts the average pain (BPI item 3) and item 3 (abnormal sensitivity to touch) predicts both worst intensity (BPI item1) as pain intensity during the session (item 4 BPI) and the overall mean pain. For the DN4 questionnaire items, and positively, item 2 (painful cold) could predict the worst pain, pain during the session and the overall mean; Item 7 (itching) could also predict the least, average pain, pain during the session and the overall mean.

TABLE 7. Summary of the analysis of association between different items of LANSS and DN4 questionnaires with items of the intensity dimension of pain brief pain questionnaire.

Items	Worst pain	Least pain	Avarage pain	Pain in session	mean
LANSS					
Ítem 1	NS	NS	+	NS	NS
Ítem 2	NS	NS	NS	NS	NS
Ítem 3	+	NS	NS	+	+
Ítem 4	NS	NS	NS	NS	NS
Ítem 5	NS	NS	NS	NS	NS
Ítem 6	NS	NS	NS	NS	NS
Ítem 7	NS	NS	NS	NS	NS
DN4					
Ítem 1	NS	NS	NS	NS	NS
Ítem 2	+	NS	NS	+	+
Ítem 3	NS	NS	NS	NS	NS
Ítem 4	NS	NS	NS	NS	NS
Ítem 5	NS	NS	NS	NS	NS
Ítem 6	NS	NS	NS	NS	NS
Ítem 7	NS	+	+	+	+
Ítem 8	NS	NS	NS	NS	NS
Ítem 9	NS	NS	NS	NS	NS
Ítem 10	NS	NS	NS	NS	NS

LANSS items: item 1, pricking, tingling, pins and needles; item 2, skin discoloration; item 3, light touch pain; item 4, electric shocks, jumping, bursting; item 5, burning, hot; item 6, allodynia; item 7, altered pinprick threshold.

DN4 items: item 1, burning; item 2, painful cold; item 3, electric shocks; item 4, tingling; item 5, pins and needles; item 6, numbness; item 7, itching; item 8, hypoesthesia to touch; item 9, hypoesthesia to prick; item 10, pain caused or increased by brushing.

NS, not significant; +, positive association, -, negative association

The adjusted models (septwise) are shown, with a significance level of $P < 0.05$.

The results of the prediction analysis, for the dimension of interference with daily activities (with 7 items and a global mean) by the different items of the LANSS and DN4 questionnaire, (Table. 8), a positive correlation shown between the questionnaire items LANSS, item 3 (abnormal sensitivity to touch) predicts mood and the overall average, item 5 (heat and burning) predicts the enjoyment of life, item 6 (allodynia) predicts the general activity, relations with others and sleep, while item 7 (altered pinprick threshold) only predicts interference with habitual work.

TABLE 8. Summary of the analysis of association between different items of LANSS and DN4 questionnaires with items of the intensity dimension of pain brief pain questionnaire.

Items	General activity	Mood	Walking ability	Habitual work	Relations with others	Sleep	Enjoing life	mean
LANSS								
Item 1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Item 2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Item 3	NS	+	NS	NS	NS	NS	NS	+
Item 4	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Item 5	NS	NS	NS	NS	NS	NS	+	NS
Item 6	+	NS	—	NS	+	+	NS	NS
Item 7	NS	NS	NS	+	NS	NS	NS	NS
DN4								
Item 1	NS	+	NS	NS	+	NS	+	NS
Item 2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Item 3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Item 4	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Item 5	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Item 6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Item 7	NS	NS	NS	NS	NS	+	NS	NS
Item 8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Item 9	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Item 10	+	NS	—	NS	NS	NS	NS	NS

LANSS items: item 1, pricking, tingling, pins and needles; item 2, skin discoloration; item 3, light touch pain; item 4, electric shocks, jumping, bursting; item 5, burning, hot; item 6, allodynia; item 7, altered pinprick threshold.

DN4 items: item 1, burning; item 2, painful cold; item 3, electric shocks; item 4, tingling; item 5, pins and needles; item 6, numbness; item 7, itching; item 8, hypoesthesia to touch; item 9, hypoesthesia to prick; item 10, pain caused or increased by brushing.

NS, not significant; +, positive association, —, negative association

The adjusted models (septwise) are shown, with a significance level of $P < 0.05$.

For the DN4 questionnaire, also, positively, item 1 (burning) may be directly related to mood, the relations with others and the enjoyment of life, item 7 (itching) with sleep, and item 10 (pain caused or increased by brushing) could predict the overall activity.

Conclusions

GENERAL CONCLUSIONS

The DN4 questionnaire is especially recommended for the identification of patients with peripheral neuropathic pain in clinical practice component, while the LANSS questionnaire also provides information on the intensity

Is the pain intensity itself, rather than the characteristics of the same, which it predicts the interference with activities of daily living.

PARTICULAR CONCLUSIONS

This study documents the high discriminative value of the Spanish version of the LANSS pain scale and the DN4 questionnaire for the detection of peripheral neuropathic pain. The DN4 questionnaire is particularly recommended for identifying patients with neuropathic pain in clinical practice and in research studies.

Tingling and numbness in the DN4 questionnaire, and light touch pain and altered pinprick threshold in the LANSS scale, are the most important features of neuropathic pain.

Both the intensity of pain, as the percentage of patients with severe pain, were significantly higher in the group of subjects with neuropathic pain component than in the group of patients with nociceptive pain. Furthermore, the presence of neuropathic component is associated with increased interference in the activities of daily living in relation to nociceptive pain subjects.

Score at LANSS viewing is associated consistently and significantly with pain intensity (minimum, average and average), measured using the Brief Pain Questionnaire (BPI).

In the LANSS questionnaire items corresponding to abnormal sensitivity to touch and altered perception threshold to pinprick, which were the most discriminant in the analysis of ROC curves. behave as predictors of pain intensity, although with different degrees of significance,

The score obtained by the DN4 questionnaire does not predict the intensity of pain in the BPI scale, but specific items of DN4 questionnaire behave as predictors, such as stinging, showing association with least pain, average pain, mean pain and pain during the session, and the painful cold that shows association with the maximum intensity of pain.

The interference of pain with the different activities of daily living is strongly associated with the average intensity of the pain, but weakly with neuropathic characteristics.

References

1. Bennett GJ. Neuropathic pain: new insights, new interventions. *Hosp Pract* (1995) [Internet]. 1998 Oct 15 [cited 2013 Aug 21];33(10):95–8, 101–4, 107–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9793544>
2. Serra J. Overview of neuropathic pain syndromes. *Acta Neurol Scand Suppl* [Internet]. 1999 Jan [cited 2013 Aug 21];173:7–11; discussion 48–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10819087>
3. Gálvez R, Rejas J, Pérez M, Gómez M. [Prevalence of neuropathic pain in Spain: clinical, working and health care implications]. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2005 Jul 9 [cited 2013 Aug 21];125(6):221–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16022836>
4. Bennett MI, Smith BH, Torrance N, Lee AJ. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. *Pain* [Internet]. 2006 Jun [cited 2014 Jan 22];122(3):289–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540249>
5. Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain* [Internet]. 2006 Apr [cited 2013 Aug 21];7(4):281–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618472>
6. Jensen TS, Finnerup NB. Management of neuropathic pain. *Curr Opin Support Palliat Care* [Internet]. 2007 Aug [cited 2013 Aug 21];1(2):126–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18685353>
7. Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* [Internet]. 2008 Jun [cited 2013 Aug 21];136(3):380–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17888574>
8. Nicholson B. Differential diagnosis: nociceptive and neuropathic pain. *Am J Manag Care* [Internet]. 2006 Jun [cited 2013 Dec 30];12(9 Suppl):S256–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16774457>
9. Crump J, Griego JM, Vargas-Gómez JJ, Rodríguez R, León MX, Moyano J, et al. [Guidelines for the clinical management of neuropathic pain (I). Protocol]. *Rev Neurol* [Internet]. 2005 [cited 2014 Jan 1];40(4):229–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15765318>
10. Attal N, Cruccu G, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, et al. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2013 Aug 14];13(11):1153–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038030>

11. Guevara-López U, Covarrubias-Gómez A, García-Ramos G, Hernández-Jiménez S. [Practice guidelines for neuropathic pain management]. *Rev Invest Clin* [Internet]. 2006 [cited 2014 Jan 1];58(2):126–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16827265>
12. Finnerup NB, Otto M, Jensen TS, Sindrup SH. An evidence-based algorithm for the treatment of neuropathic pain. *MedGenMed* [Internet]. 2007 Jan [cited 2013 Aug 21];9(2):36. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1994866&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Moulin DE, Clark AJ, Gilton I, Ware MA, Watson CPN, Sessle BJ, et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag* [Internet]. 2007 Jan [cited 2013 Aug 12];12(1):13–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2670721&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, Baron R, Gourlay GK, Haanpää ML, et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2010 Mar [cited 2013 Aug 9];85(3 Suppl):S3–14. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2844007&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. NICE. National Institute for Health and Clinical Excellence [Internet]. 2010. Available from: www.nice.org.uk/guidance/CG96
16. Bril V, England J, Franklin GM, Backonja M, Cohen J, Del Toro D, et al. Evidence-based guideline: Treatment of painful diabetic neuropathy: report of the American Academy of Neurology, the American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *PM R* [Internet]. 2011 Apr [cited 2013 Aug 21];3(4):345–52, 352.e1–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21497321>
17. Rey R, Arizaga E, Verdugo R, Vidal O, Jreige A, Juárez H, et al. [Recommendations of the Latin-American network for the study and treatment of the neuropathic pain]. *Drugs Today (Barc)* [Internet]. 2011 May [cited 2013 Aug 21];47 Suppl B:1–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785756>
18. Bouhassira D, Attal N, Alchaar H, Boureau F, Brochet B, Bruxelle J, et al. Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain* [Internet]. 2005 Mar [cited 2013 Aug 21];114(1-2):29–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15733628>
19. Pérez C, Gálvez R, Insausti J, Bennett M, Ruiz M, Rejas J. [Linguistic adaptation and Spanish validation of the LANSS (Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs) scale for the diagnosis of neuropathic pain]. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2006 Oct 7 [cited 2013 Aug 21];127(13):485–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17043002>
20. Perez C, Galvez R, Huelbes S, Insausti J, Bouhassira D, Diaz S, et al. Validity and reliability of the Spanish version of the DN4 (Douleur Neuropathique 4 questions) questionnaire for differential diagnosis of pain syndromes associated to a neuropathic

- or somatic component. Health Qual Life Outcomes [Internet]. 2007 Jan [cited 2013 Aug 21];5:66. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2217518&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
21. Bisaga W, Dorazil M, Dobrogowski J, Wordliczek J. A comparison of the usefulness of selected neuropathic pain scales in patients with chronic pain syndromes : a short communication. *Adv Palliat Med*. 2010;9(4):117–22.
 22. Unal-Cevik I, Sarioglu-Ay S, Evcik D. A comparison of the DN4 and LANSS questionnaires in the assessment of neuropathic pain: validity and reliability of the Turkish version of DN4. *J Pain* [Internet]. 2010 Nov [cited 2013 Aug 21];11(11):1129–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20418179>
 23. Kingery WS. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain* [Internet]. 1997 Nov [cited 2013 Aug 21];73(2):123–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9415498>
 24. Cruccu G, Anand P, Attal N, Garcia-Larrea L, Haanpää M, Jørum E, et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment. *Eur J Neurol* [Internet]. 2004 Mar [cited 2013 Aug 21];11(3):153–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009162>
 25. Patrick DL, Deyo RA. Generic and disease-specific measures in assessing health status and quality of life. *Med Care* [Internet]. 1989 Mar [cited 2013 Aug 21];27(3 Suppl):S217–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2646490>
 26. Alonso J, Regidor E, Barrio G, Prieto L, Rodríguez C, de la Fuente L. [Population reference values of the Spanish version of the Health Questionnaire SF-36]. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 1998 Oct 10 [cited 2014 Jan 1];111(11):410–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834913>
 27. Alonso J, Anto JM, Moreno C. Spanish version of the Nottingham Health Profile: translation and preliminary validity. *Am J Public Health* [Internet]. 1990 Jun [cited 2013 Aug 21];80(6):704–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1404742&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 28. Badia X, Muriel C, Gracia A, Núñez-Olarte JM, Perulero N, Gálvez R, et al. [Validation of the Spanish version of the Brief Pain Inventory in patients with oncological pain]. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2003 Jan 25 [cited 2013 Aug 24];120(2):52–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12570914>
 29. Martínez-Salio A, Gómez De la Cámara A, Ribera Canudas MV, Montero Homs J, Blanco Tarrío E, Collado Cruz A, et al. [Diagnosis and treatment of the neuropathic pain]. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2009 Oct 31 [cited 2013 Aug 21];133(16):629–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19640552>
 30. Daut RL, Cleeland CS, Flanery RC. Development of the Wisconsin Brief Pain Questionnaire to assess pain in cancer and other diseases. *Pain* [Internet]. 1983 Oct [cited 2013 Aug 21];17(2):197–210. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6646795>
 31. Cleeland CS, Ryan KM. Pain assessment: global use of the Brief Pain Inventory. *Ann Acad Med Singapore* [Internet]. 1994 Mar [cited 2014 Jan 10];23(2):129–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8080219>
 32. Zelman DC, Dukes E, Brandenburg N, Bostrom A, Gore M. Identification of cut-points for mild, moderate and severe pain due to diabetic peripheral neuropathy. *Pain* [In-

- ternet]. 2005 May [cited 2013 Aug 24];115(1-2):29–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15836967>
33. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* [Internet]. 1977 Mar [cited 2014 Feb 19];33(1):159–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/843571>
34. Gálvez R, Pardo A, Cerón JM, Villasante F, Aranguren JL, Saldaña MT, et al. [Linguistic adaptation into Spanish and psychometric validation of the ID-Pain questionnaire for the screening of neuropathic pain]. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2013 Aug 21];131(15):572–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19080838>

Evaluación de la eficacia de la electroacupuntura en pacientes con dolor crónico por radiculopatía lumbar

**Gutiérrez Lomas V, Caballero MD,
del Pozo E, Gálvez R**

Resumen

Hay evidencias del papel beneficioso de la acupuntura como monoterapia o asociada a otras terapias activas en el tratamiento de la lumbalgia crónica. La electroacupuntura es una variante de la acupuntura cuya eficacia ha sido menos estudiada. Aunque existen resultados confusos, algunos estudios arrojan resultados positivos a favor de esta técnica en el tratamiento del dolor neuropático de origen lumbar, tanto en el animal de experimentación como en el humano.

El objetivo de este proyecto es evaluar la eficacia analgésica de la técnica de electroacupuntura en pacientes con dolor crónico por radiculopatía lumbar.

Se trata de un estudio clínico, aleatorizado, controlado, cruzado y con evaluación ciega por terceros, que pretende evaluar la eficacia de la electroacupuntura, como tratamiento complementario a la terapia farmacológica analgésica, en pacientes con dolor crónico diagnosticados de radiculopatía lumbar.

El estudio se realiza en el H. U. Virgen de las Nieves de Granada, en la Unidad del Dolor, entre cuyas prestaciones de servicio público se incluye la acupuntura, desde hace más de cinco años.

Los pacientes que reúnen los requisitos de selección son asignados a cada brazo de tratamiento y se evaluarán a lo largo de 5 visitas de estudio repartidas en un período de 38 semanas, antes, durante y después de haber realizado las sesiones de acupuntura protocolizadas (12 sesiones).

Los parámetros a evaluar son: dolor (variable principal), calidad de vida, sueño, estado psicológico (ansiedad y depresión), satisfacción del paciente y seguridad de la técnica. Además, se realizará un análisis genético de los polimorfismos COMT val158met (para valorar si está asociado a la respuesta al dolor) y OPMR1 (para determinar la asociación entre este polimorfismo y la respuesta analgésica de los opioides).

Los resultados preliminares obtenidos hasta ahora muestran una mejora significativa en los parámetros de dolor, discapacidad lumbar y depresión.

Introducción

La acupuntura es una tecnología de salud basada en la medicina tradicional china, que cada vez es más usada dentro de los arsenales terapéuticos de analgesia en la medicina occidental. A pesar de la gran cantidad de estudios realizados hasta la fecha, aún no se conoce de manera clara su mecanismo de acción. Se manejan dos hipótesis: (1) la estimulación de fibras aferentes A-delta produciría un aumento de la liberación de endorfinas y serotonina [1] y (2) la teoría del «control de la puerta de entrada» o «Gate Control» que asume que el impulso generado por las fibras mielinizadas de mayor calibre (táctiles) inhibirían las aferencias generadas por fibras amielínicas de pequeño calibre (nociceptivas) [2].

Se han descrito evidencias de los beneficios de la acupuntura en el tratamiento de la lumbalgia crónica, tanto en metaanálisis [3, 4, 5, 6, 7, 8], como en ensayos clínicos [9, 10, 11].

Además, la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA) en su informe de 2008 titulado «Eficacia de la acupuntura en el dolor lumbar y en el dolor agudo en diferentes situaciones» [12], basándose en la evidencia científica encontrada hasta la fecha (2007) concluye que la acupuntura, en combinación con otras intervenciones activas (medicación, TENS, educación), es eficaz para el alivio del dolor en la lumbalgia crónica a corto y medio plazo (evidencia fuerte), e incluso sugiere su utilización en monoterapia (evidencia moderada). La evaluación positiva de AETSA ha propiciado que la Consejería de Salud apostase por un Proceso Asistencial Integrado de Acupuntura y por la cobertura progresiva de plazas de acupuntores en la sanidad pública andaluza.

La electroacupuntura es una variante de la acupuntura [13] que ha sido menos estudiada. Existen resultados confusos en relación a su eficacia [12], aunque algunos estudios arrojan datos positivos a favor de la eficacia de esta técnica en el tratamiento del dolor neuropático de origen lumbar, tanto en el animal de experimentación en un modelo de contracción del nervio ciático [14], como en estudios realizados en el humano [15,16,17].

El dolor neuropático es un dolor producido como consecuencia directa de una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial [18]. Entre las entidades clínicas que cursan con dolor neuropático se encuentra la radiculopatía lumbar. Se trata de una patología de las raíces espinales a nivel lumbar [19] producida, en la mayoría de las ocasiones, por hernia del disco, aunque también puede ser ocasionada por otros procesos [20]. Se trata de una patología con fuerte repercusión clínica [21], sanitaria [22] y social [23].

Las herramientas farmacológicas no proporcionan un alivio total en esta entidad, y es necesario completar el tratamiento con otras opciones terapéuticas no farmacológicas [22].

Por otro lado, entre los factores que influyen la sensibilidad dolorosa de los sujetos se encuentran las características genotípicas. Existen multitud de polimor-

fismos que pueden influenciar la respuesta al dolor y a los opioides. En nuestro estudio hemos seleccionado los polimorfismos COMT met158val y OPRM1.

El polimorfismo COMT met158val se asocia con diferencias en el umbral doloroso [24] y en la respuesta a los fármacos opioides [25]. No se conoce si existe asociación entre este polimorfismo genético y la respuesta analgésica a la electroacupuntura.

El polimorfismo OPRM1 se relaciona con una diferencia en la eficacia y tolerancia/toxicidad de los opioides [26].

Por último, el mecanismo analgésico por el cual actúa la electroacupuntura no está claramente definido, pero estaría relacionado con un aumento de betaendorfinas en sangre [27].

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente mencionados nos hemos propuesto evaluar la eficacia de la electroacupuntura en el tratamiento del dolor y de la comorbilidad asociada en esta patología, partiendo de la hipótesis de que se trata de una técnica complementaria eficaz en el tratamiento del dolor crónico por radiculopatía lumbar.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es evaluar la eficacia analgésica de la técnica de electroacupuntura en pacientes con dolor crónico por radiculopatía lumbar.

Los objetivos secundarios son:

- Evaluar la eficacia de la técnica de electroacupuntura en el sueño, calidad de vida y estado psicológico (depresión y ansiedad).
- Determinar si la electroacupuntura modifica los niveles de betaendorfinas en plasma.
- Determinar si las variaciones genéticas en relación con el polimorfismo val¹⁵⁸met del gen de la COMT (SNP Rs4680) y OPRM1 influyen en la respuesta al dolor y al tratamiento con acupuntura
- Evaluar el nivel de seguridad de la técnica.
- Evaluar el nivel de satisfacción de los pacientes con el procedimiento.

Metodología

Diseño. Se trata de un estudio clínico observacional, controlado, abierto, con aleatorización del periodo del tratamiento y evaluación ciega por terceros.

ASPECTOS ÉTICOS DE INVESTIGACIÓN

Será necesaria la obtención del consentimiento informado por escrito para la inclusión de los pacientes en el estudio.

Al tratarse de un estudio observacional se llevará a cabo según los requerimientos expresados en las normas internacionales relativas a la realización de estudios epidemiológicos, recogidas en las International Guidelines for Ethical Review of Epidemiological Studies (Council for the International Organizations of Medical Sciences —CIOMS—, Ginebra, 1991) [29].

Igualmente, se cumplirá lo dispuesto en la Declaración de Helsinki (revisión de Seúl, Octubre de 2008) [30] y el Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina [31] (Convenio relativo a los derechos humanos y la biomedicina), hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997 y firmado en España el Instrumento de ratificación el 23 de julio de 1999 (BOE de 11 de noviembre). Ambos definen los principios que deben ser respetados escrupulosamente por todas las personas implicadas en la investigación.

La utilización de las muestras biológicas con fines de investigación biomédica se registrará según la ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica [32].

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes se ajustará a lo dispuesto en la ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal [33] y a la directiva 95/46/CE, del parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre, DOCE L 281, de 23 de noviembre, relativa a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos [34]. Por tanto toda la información obtenida será anonimizada y no podrá correlacionarse con los sujetos de estudio.

Los pacientes podrán continuar recibiendo su medicación habitual, tanto pausada como de rescate, y no existirá interferencia con la práctica clínica habitual.

Los investigadores declaran que no existe conflicto de intereses.

Población

La población estará constituida por 84 pacientes (ver cálculo del tamaño muestral) reclutados de manera consecutiva entre aquéllos que se encuentren en la lista de espera de tratamiento por dolor crónico neuropático debido a radiculopatía lumbar, tengan indicación de realización de electroacupuntura y cumplan todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión. El ámbito de actuación del estudio es la Unidad del Dolor del H.U. Virgen de las Nieves de Granada.

Los *criterios de inclusión* de los pacientes son: Edad entre 18 y 67 años; paciente diagnosticado de dolor por radiculopatía lumbar y confirmado por técnicas neurofisiológicas y la exploración somatosensorial de médicos especialistas, y que se incluya en cualquiera de las siguientes subclasificaciones de la CIE-10: M51.1 (Trastornos de disco lumbar y otros, con radiculopatía); M54.1 (Radiculopatía) y M54.4 (Lumbago con ciática), duración del dolor superior a 6 meses; intensidad del dolor previo a la intervención de 4 puntos o más en una escala EVA de 0 a 10; paciente que sea visto en consulta médica de la Unidad del Dolor y

tenga como decisión de la misma complementar su tratamiento farmacológico con terapia de electroacupuntura; consentimiento informado por escrito para su participación en el estudio.

Los *criterios de exclusión* de los pacientes son: deterioro cognitivo que pudiera impedir la comprensión de lo redactado en el consentimiento informado; pacientes que se encuentren pendientes de valoración de incapacidad, con sospecha de simulación o de cualquier enfermedad psiquiátrica que afecte a su percepción de la enfermedad (neurosis de renta); participar en otros estudios simultáneamente o hasta 6 meses antes del inicio; presencia de otras enfermedades concomitantes (fibromialgia, procesos neoplásicos, neurodegenerativos, autoinmunes...) que alteren la enfermedad a estudiar, las pruebas o sus resultados; mujeres embarazadas o lactantes; antecedentes personales de haber recibido acupuntura alguna vez en su vida; dermatopatías generalizadas; plaquetopenia o tratamiento con anticoagulantes orales.

El participante podrá revocar en cualquier momento su consentimiento para formar parte del estudio, así como la utilización de sus datos en el análisis, sin justificar su decisión, y sin que por ello se derive responsabilidad ni perjuicio alguno. Una vez firmado el consentimiento informado, se considerará que un paciente finaliza de forma prematura el estudio cuando ocurra una de las siguientes causas:

Retirada de consentimiento; pérdida de seguimiento; si deja de acudir a las visitas de estudio por su enfermedad o cualquier otro motivo durante el período de investigación; si el paciente, en el curso del estudio, desarrolla cualquiera de las circunstancias anteriormente mencionadas, como criterios de exclusión o deja de cumplir cualquiera de los criterios de inclusión; cese del tratamiento de acupuntura por decisión médica y, por último, fallecimiento.

Los datos obtenidos antes de un fin prematuro, quedarán debidamente registrados y contabilizados en el cómputo general del estudio. Se usarán para realizar las estadísticas comparativas y de evaluación de eficacia, arrastrando los datos de la última evaluación hasta el final (análisis por intención de tratar).

Protocolo

Los pacientes se incluirán en el estudio de forma consecutiva, según sean atendidos en la consulta de la Unidad del dolor. Una vez comprobados los criterios de selección, y tras obtener su consentimiento, serán asignados al Grupo A, o al Grupo B mediante un procedimiento aleatorio (secuencia de números aleatorios generada por un software específico, M.A.S. 2.1 @ Glaxo Wellcome). La custodia de la secuencia la realizará una persona ajena al grupo de investigación.

El estudio constará de 3 fases. La Fase 1 es común a ambos Grupos y constituye un período de 4 semanas en lista de espera. Las 2 fases siguientes son períodos de igual duración, 17 semanas, que se inician alternativamente en cada Grupo (fase

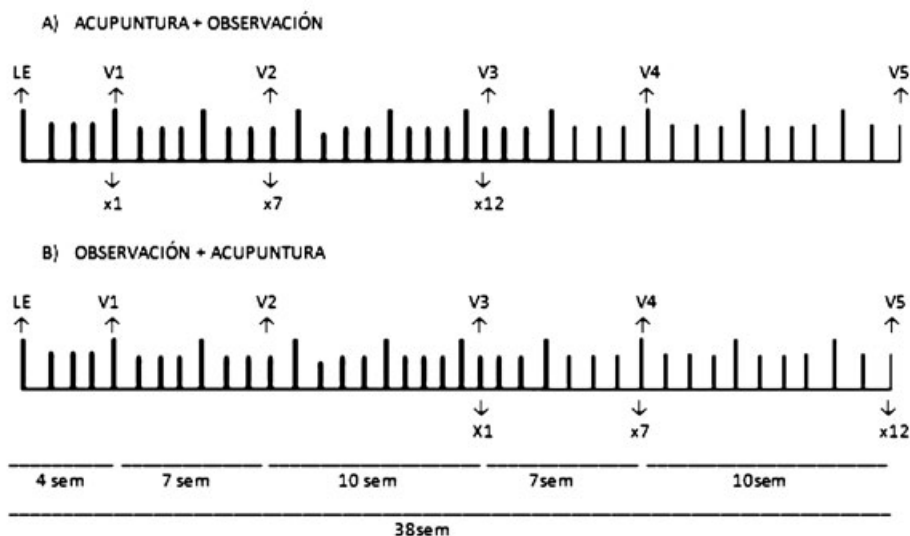


FIGURA 1. Curso temporal y secuencia de Fases en cada Grupo del estudio.

Una línea vertical representa 1 semana de tiempo.

con terapia de electroacupuntura y otra fase de observación). Las Fases 2 y 3 del grupo B son simétricas a las del grupo A, pero realizadas a la inversa (ver Figura 1).

- GRUPO A= Fase 1 (Lista de espera) + Fase 2 (Acupuntura) + Fase 3 (Observación).
- GRUPO B= Fase 1 (Lista de espera) + Fase 2 (Observación) + Fase 3 (Acupuntura).

El paciente permanecerá 38 semanas en el estudio repartidas de la siguiente forma:

- 4 semanas en la fase 1 (lista de espera).
- 17 semanas en la fase 2 (acupuntura / observación).
- 17 semanas en la fase 3 (acupuntura / observación).

El diseño del estudio depara una invasión mínima en el campo asistencial, y se fundamenta en las recomendaciones de la Sociedad Española del Dolor (SED). Es decir, las investigaciones en casos de dolor neuropático deben realizarse «en condiciones de práctica clínica rutinaria, con el fin de optimizar su abordaje terapéutico y de generar evidencias que racionalicen la toma de decisión terapéutica de

los profesionales», y donde se incluye a la acupuntura como un elemento más del arsenal terapéutico disponible para dicha patología [28].

Visitas

Transcurrida la primera fase (lista de espera), la Fase 2 del Grupo A, consistirá en 3 visitas de estudio, V1, V2 y V3, durante las cuales se aplicará tratamiento con acupuntura (ver Figura 1).

- V1: Primera visita de la fase de acupuntura. Se realizará justo tras haber finalizado la fase anterior de lista de espera y antes de iniciar la fase con acupuntura.
- V2: Segunda visita de la fase de acupuntura. Se realizará tras haber completado la mitad del tratamiento con acupuntura, antes de la séptima sesión, es decir, a las 7 semanas del inicio del tratamiento.
- V3: Tercera visita de la fase de acupuntura. Se realizará tras haber completado la última sesión con acupuntura, es decir, a las 17 semanas del inicio del tratamiento.

La Fase 3 del Grupo A consistirá en un periodo de observación, en el cual se realizarán 2 visitas de estudio: V4 y V5.

- V4: Primera visita de la fase de observación. Esta visita se realiza a las 7 semanas de haber finalizado las sesiones de acupuntura.
- V5: Segunda visita de la fase de observación. Esta visita se realiza a las 17 semanas de haber finalizado *las sesiones de acupuntura*.

Por su parte, la Fase 2 del Grupo B consistirá en el periodo de observación, en el que se realizarán 3 visitas de estudio: V1, V2 y V3.

- V1: Se realizará justo tras haber finalizado la fase anterior de lista de espera y al iniciar la fase de observación.
- V2: A las 7 semanas de la visita anterior.
- V3: A las 17 semanas de V1 y justo al iniciar la fase de acupuntura.

La Fase 3 del grupo B consistirá en el periodo de acupuntura. Se realizarán las siguientes visitas de estudio: V4 y V5 (Fig. 1).

- V4: Se realizará tras haber completado la mitad del tratamiento con acupuntura, antes de la séptima sesión, es decir, a las 7 semanas del inicio del tratamiento.
- V5: Se realizará tras haber completado la última sesión con acupuntura, es decir, a las 17 semanas del inicio del tratamiento.

VARIABLES ANALIZADAS

Variable dependiente principal: Dolor

La intensidad se evalúa con la Escala Analógica Visual de 0 a 10 puntos, en la escala BPI (Brief Pain Inventory) que es numérica de 0 a 10 puntos. Las características neuropáticas se valoran mediante el cuestionario DN4. También se valorará la cantidad de medicación de rescate consumida.

Variables dependientes secundarias

- Sueño, evaluado mediante el cuestionario MOS (Sleep Scale from the Medical Outcomes Study).
- Calidad de vida relacionada con la salud, mediante el cuestionario de discapacidad lumbar de Oswestry y el cuestionario de calidad de vida SF-36.
- Estado psicológico (ansiedad y depresión), mediante la escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión (HAD).
- Niveles de betaendorfinas en plasma según se ha descrito previamente [27].
- Seguridad de la técnica, registrada según encuesta de reacciones adversas.
- Satisfacción con la técnica, mediante las escalas CGI y PGI.

Principales variables independientes

- Polimorfismos de COMT val158met y OPRM1 [24, 25, 26].
- Características sociodemográficas.

DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES

Las medidas de eficacia y otros parámetros se recogerán siguiendo el esquema:

- Registros sociodemográfico y general de salud. Se administrarán en la visita 1.
- Registros, encuestas, escalas y cuestionarios de salud: Registro de seguimiento de salud, encuesta de características del dolor BPI, escala de dolor neuropático DN-4, escala visual analógica de dolor (EVA), escala de discapacidad lumbar de Oswestry, cuestionario de calidad de vida SF-36, escala del sueño de MOS, y la escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión (HAD). Se administrarán en las visitas 1, 2, 3, 4 y 5.
- Determinación de beta-endorfinas: Se recogerán muestras de sangre en las sesiones de acupuntura 1, 4 y 6.
- Polimorfismos genéticos: Se tomará la muestra de saliva en la Visita 1.
- Escalas de satisfacción: Escalas de impresión de mejoría global del paciente (PGI-I) y escala de mejoría global del clínico (CGI). Se administrarán al finalizar el tratamiento.

Se administrará una encuesta de reacciones adversas en todas las sesiones de acupuntura (x1 a x12). La elección de las encuestas de salud se basa mayoritariamente en las recomendaciones realizadas por la Sociedad Española del Dolor para las investigaciones que se realicen en Unidades del Dolor [28].

Tratamiento de los sujetos experimentales

No se realizará ningún tratamiento distinto al habitual del centro.

La electroacupuntura se aplicará según los criterios profesionales indicados, pero utilizando siempre los mismos para todos los pacientes del estudio. Sólo se seleccionarán a los pacientes que tengan indicación de electroacupuntura según el criterio profesional de los médicos responsables de la Unidad del Dolor.

La medicación pautada será la habitual del centro para el diagnóstico y estado del paciente. Se permite el consumo de fármacos analgésicos (opioides o no opioides), AINES y fármacos coadyuvantes en el tratamiento del dolor como antidepresivos, antiepilépticos, neurolépticos, ansiolíticos, etc., siempre y cuando dicha medicación haya sido prescrita en la Unidad del Dolor o su prescripción haya sido realizada por otro médico y autorizada por los médicos de la Unidad. También se permite el uso de la medicación de rescate prescrita como tal en la Unidad del Dolor.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tamaño muestral

Se ha determinado tomando en consideración estudios previos que demostraban diferencias estadísticas en la eficacia analgésica de la acupuntura en pacientes con lumbalgia crónica [9].

Para conseguir una potencia del 80,0% en la detección de estas diferencias mediante prueba T-Student bilateral para dos muestras independientes, teniendo en cuenta que el nivel de significación es del 5%, será necesario incluir 26 pacientes en cada grupo. Asimismo, si comparamos los valores de otras variables secundarias, como SF-36, los valores de salud física para el grupo acupuntura fueron de 40.5 ± 9.7 y 33.9 ± 9.5 para el control. Utilizando el mismo contraste y los mismos valores de significación y potencia, el número de pacientes por grupo sería de 35.

El tamaño de 35 pacientes por Grupo nos permitiría encontrar diferencias significativas en la mayor parte de las variables resultado medidas (intensidad del dolor, salud física, mental, subescala del dolor del SF-36, etc.). En previsión de posibles pérdidas que pudieran surgir durante el seguimiento, se incrementará esta cantidad en un 20%, lo que totalizará 84 pacientes en el estudio, 42 en cada uno de los grupos.

Análisis descriptivo de datos

Se realizará en primer lugar un análisis descriptivo de las principales variables estudiadas. Para las variables cuantitativas se calculará la media y desviación típica, o mediana y percentiles en caso de no normalidad. Las variables cualitativas se expresarán mediante frecuencias absolutas y relativas. Los datos se representarán mediante tablas de frecuencias y gráficos.

Análisis bivalente

Previo al análisis bivalente, se realizará el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si los datos se ajustan a una distribución normal, con el fin de utilizar test paramétricos o no paramétricos. Para contrastar la hipótesis de igualdad de medias en cuanto a las principales variables medidas (intensidad del dolor, niveles de betaendorfinas y cortisol, salud mental, calidad de vida, etc.), se utilizará el test de la t de Student para muestras independientes o Mann-Whitney, según corresponda; e igual tratamiento para el resto de variables cuantitativas. En el caso comparación de variables cualitativas, se empleará el test de la chi-cuadrado de Pearson o Fisher cuando sea necesario.

Análisis multivariante

Se construirá un modelo lineal general de medidas repetidas para estudiar la evolución del dolor en los diferentes momentos de tiempo estudiados (inicial, x semanas, x meses), considerando como factor intersujetos el grupo. De esta forma podremos evaluar si existen diferencias significativas en los propios pacientes en las diferentes visitas estudiadas, así como en los diferentes grupos. Para todos los contrastes se considerará un nivel de significación de 0.05. El software estadístico utilizado será el SPSS 20.0

Resultados

Se presentan los resultados preliminares del proyecto que se encuentra en fase de ejecución en estos momentos. Se han reclutado 35 pacientes, 20 en el grupo A (electroacupuntura-observación) y 15 en el grupo B (observación – electroacupuntura). Las características sociodemográficas y clínicas basales fueron similares.

La Tabla 1 describe las características basales de ambos brazos del estudio, tanto sociodemográficas, como de los parámetros de análisis. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos Grupos.

Se analizaron las variables: dolor (EVA), discapacidad lumbar (cuestionario de Oswestry), sueño (escala MOS), ansiedad y depresión (escala HAD), en las 5 visitas de estudio: V1, V2, V3, V4, V5. Existió una buena tolerabilidad a la técnica y un número muy limitado de eventos adversos, todos de bajo grado.

TABLA 1. Características basales de los pacientes incluidos.

Variable	Grupo A (n=20)	Grupo B (n=15)
EDAD (años)	51,6 +/- 2,1	53,3 +/- 2,72
SEXO (V/M)	9 / 11	5 / 10
EVA INICIAL	6,23 +/- 0,28	6,59 +/- 0,37
DURACION DOLOR (meses)	54,10 +/- 9,92	44,2 +/- 9,77
OSWESTRY	45,70 +/- 2,09	46,53 +/- 3,188
HAD ANSIEDAD	9,80 +/- 0,99	10,6 +/- 0,89
HAD DEPRESION	9,80 +/- 0,74	10,06 +/- 1,32
MOS (Horas)	4,7 +/- 0,41	4,13 +/- 0,50

Datos expresados como media $\pm$ SEM

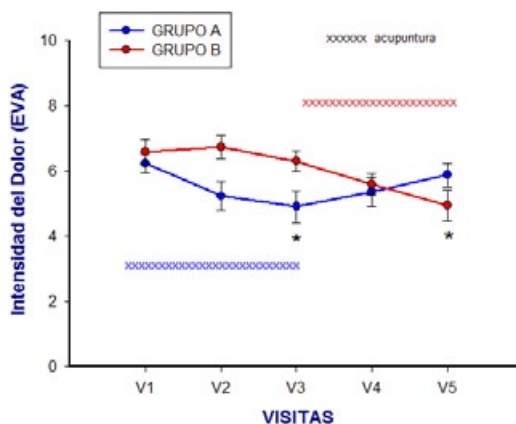


FIGURA 2. Evolución del dolor (Escala EVA) en ambos Grupos de pacientes. Las "x" indican los periodos con sesiones de acupuntura.

Diferencias estadísticamente significativas en relación a V1 en Grupo A, y a V3 en Grupo B: * $P < 0.05$

El tratamiento con electro-acupuntura redujo el dolor y la discapacidad lumbar (Visita V3 vs V1, y V3 vs V5; $P < 0.05$) (Figuras 2, 3); mientras que las variables ansiedad, depresión y sueño mostraron tendencias positivas (Figuras 4, 5, 6). Así mismo, el tratamiento con acupuntura disminuyó la intensidad del dolor, existiendo dife-

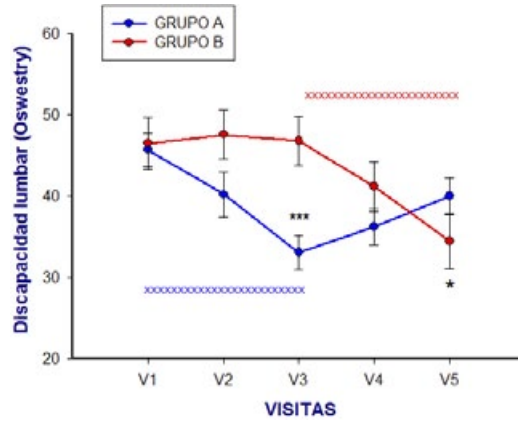


FIGURA 3. Evolución de la discapacidad lumbar (cuestionario de Oswestry).
Diferencias estadísticamente significativas en relación a V1 en Grupo A y a V3 en Grupo B: * $P < 0.05$. *** $P < 0.001$.

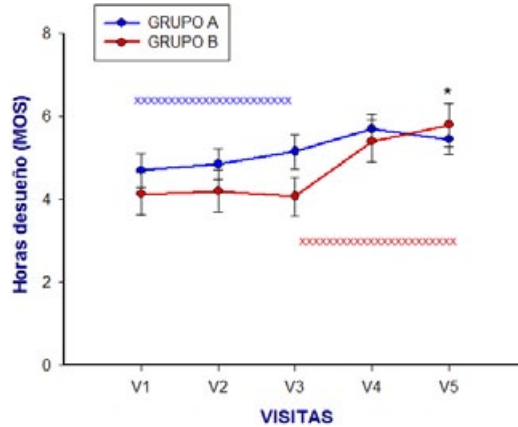


FIGURA 4. Evolución del número de horas de sueño (Cuestionario MOS).
Diferencias estadísticamente significativas en Grupo B en relación a V3: * $P < 0.05$.

rencias estadísticamente significativas en ambos brazos tras finalizar el tratamiento con acupuntura (Figura 2, Visita 3 vs Visita 1).

El procedimiento con acupuntura mejoró significativamente el porcentaje de discapacidad lumbar (evaluado mediante el cuestionario de Oswestry), en ambos

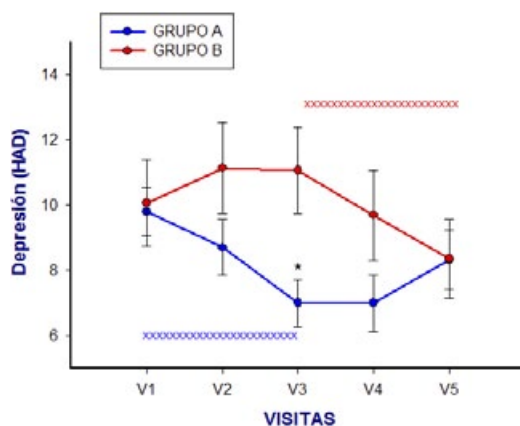


FIGURA 5. Evolución del parámetro depresión (Escala HAD).

Diferencias estadísticamente significativas en Grupo A en relación a V1: *
 $P < 0.05$.

brazos tras finalizar el tratamiento. Mostrando fuerte significación en el brazo A ($P < 0.001$) (Figura 3).

La evolución del número de horas de sueño durante el periodo de estudio, mostró en los pacientes del grupo B de tratamiento, una diferencia estadísticamente significativa (Figura 4).

En la evaluación del parámetro depresión (a través de las preguntas relacionadas en el cuestionario HAD), se observa una tendencia a la mejoría en ambos grupos de tratamiento, siendo significativa en el Grupo A (Figura 5).

Por su parte, en el parámetro ansiedad (evaluado a través de las preguntas relacionadas del cuestionario HAD), se observa una tendencia a la mejoría en ambos grupos de tratamiento tras realizar el tratamiento con electroacupuntura, aunque no alcanzó significación estadística (Figura 6).

El análisis de polimorfismos genéticos asociados con la respuesta dolorosa (COMT val158met y OPRM1), realizados en 41 pacientes se describen en Tablas 2 y 3.

La Tabla 2 muestra el resultado del análisis del test genético a los pacientes en relación al gen OPRM1, donde el 60% de los pacientes (25/41) presentaba un cambio en la base A>G (heterocigoto) en el polimorfismo OPRM1. Los polimorfismos heterocigoto y *wild type* se consideran de mala tolerancia y baja eficacia a los opioides. Esta diferencia (baja respuesta a los opioides) también se encuentra en los pacientes GG, que constituyen el 37% (15/41) de sujetos estudiados. Todos los pacientes menos 1 encajaban dentro de dichos polimorfismos. Este hallazgo se asocia con una disminución en la eficacia y tolerancia/toxicidad a los opioides [26].

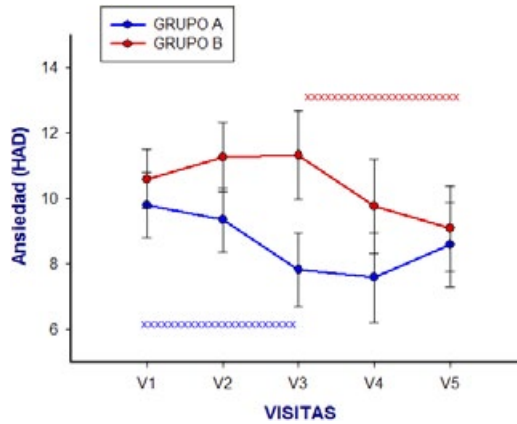


FIGURA 6. Evolución del parámetro ansiedad (Escala HAD).

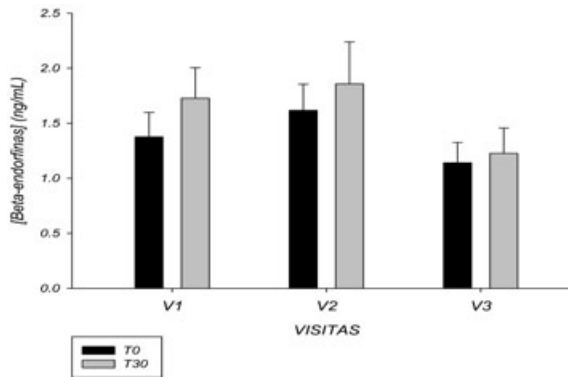


FIGURA 7. Niveles plasmáticos de beta-endorfinas.

Datos expresados como media $\pm$ SEM; N=14.

TABLA 2. Análisis de polimorfismos del gen OPMR1

HETEROCIGOTO (AG)	25/41	60.97%
MUTANTE (AA)	1/41	2.43%
WILD TYPE (GG)	15/41	36.58%

TABLA 3. Análisis de polimorfismos del gen de la COMT

HETEROCIGOTO (AG)	25/41	60.97%
MUTANTE (AA)	10/41	24.39%
WILD TYPE (GG)	6/41	14.63%

La Tabla 3 muestra el resultado del análisis genético realizado a los 41 pacientes, para el gen de la COMT. El polimorfismo *wild type* se asocia con umbrales del dolor más bajos y mayor requerimiento de opioides. Los resultados de los polimorfismos de la COMT mostraron que el 15.63% de los pacientes (6/41) presentaban la variante GG (wild type), que se asocia a un umbral del dolor más bajo y mayor requerimiento de opioides [24, 25].

Discusión

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Se prevé en el estudio la posibilidad de que se produzcan abandonos, debido especialmente al mal estado de los pacientes. El tamaño del cálculo de muestra incluye una estimación de pérdidas del 15%. Sin embargo, se presume una buena colaboración de los pacientes para realizar las encuestas, puesto que se les administrarán mientras se encuentran en la sala de espera para la sesión de acupuntura.

La principal limitación del estudio es la imposibilidad de utilizar acupuntura «sham» (o placebo). Se valoró dicha posibilidad; sin embargo, no fue admitida por los responsables de la Unidad del Dolor, debido a los siguientes motivos:

- En numerosas ocasiones la acupuntura es la última opción terapéutica disponible, debido al estado general de los pacientes, fracaso del resto de tratamientos, alergias medicamentosas, etc.).
- La saturación del Servicio impide desviar parte de sus recursos materiales y humanos hacia actividades distintas de las asistenciales. Es decir, acupuntura «sham».
- Las recomendaciones vigentes de la Sociedad Española del Dolor, con respecto a investigaciones en dolor neuropático, basadas en estudios «en condiciones de práctica clínica rutinaria» [28].

Por otra parte, para aumentar el control sobre el efecto placebo y garantizar la homogeneidad de ambos grupos de investigación, se ha utilizado un elemento metodológico diferente que consiste en aleatorizar la asignación de los

pacientes a intervención con acupuntura temprana o tardía. Con este procedimiento se indica al paciente, durante la primera visita (basal), que recibirá su tratamiento con acupuntura dentro de los plazos temporales habituales de la Unidad pero no la fecha exacta de comienzo. Así, se reduce al mínimo las posibles expectativas de mejora con respecto a la intervención. Sólo se avisará telefónicamente al paciente del inicio de la terapia, con un plazo máximo de antelación de 1 semana.

En cualquier caso, la utilización de acupuntura «*sham*» (punción mínimamente invasiva, punción en puntos erróneos, o uso de agujas retráctiles) se ha puesto en duda como verdadero método de acupuntura placebo [35, 36].

PERSPECTIVAS FUTURAS

El Proyecto continua actualmente en desarrollo, y se prevé disponer de más resultados próximamente.

Bibliografía

1. Pomeranz B. Scientific basis of acupuncture. In: Stux G, editor. Basics of Acupuncture. New York: Springer-Verlag. 1997:30-2.
2. Melzack R, Wall PD. Pain mechanism: a new theory. Science 1965; 150:971-8.
3. Furlan AD, van Tulder MW, Cherkin DC, Tsukayama H, Lao L, Koes BW, Berman BM. Acupuncture and dry-needling for low back pain. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2005; T1.
4. Manheimer E, White A, Berman B, Forys K y Ernst E. Meta-Analysis: Acupuncture for Low Back Pain. Annals of Internal Medicine 2005; 142:651-63.
5. Grupo Español de Trabajo del Programa Europeo COST B13. Guía de Práctica Clínica para la Lumbalgia Inespecífica. Visitado el 15 de diciembre de 2005. URL: www.REIDE.org.
6. Yuan J, Purepong N, Kerr DP, Park J, Bradbury I, McDonough S. Effectiveness of Acupuncture for Low Back Pain: A Systematic Review. Spine 2008; 33:887-900.
7. Madsen MV, Gøtzsche PC, Hróbjartsson A. Acupuncture treatment for pain: systematic review of randomized clinical trials with acupuncture, placebo acupuncture, and no acupuncture groups. British Medical Journal 2009; 338:3115-6.
8. Fattal C, Kong-A-Siou D, Gilbert C, Ventura M, Albert T. What is the efficacy of physical therapeutics for treating neuropathic pain in spinal cord injury patients?. Ann Phys Rehabil Med. 2009 Mar; 52:149-66.
9. Brinkhaus B, Witt CM, Jena S, Linde K, Streng A, Wagenpfeil S, Irnich D, Heinz-Ulrich Walther H-U, Melchart D, Willich SN. Acupuncture in Patients With Chronic Low Back Pain A Randomized Controlled Trial. Archives of Internal Medicine 2006; 166:450-7.

10. Thomas KJ, MacPherson H, Thorpe L, Brazier J, Fitter M, Campbell MJ, Roman M, Walters SJ, Nicholl J. Randomised controlled trial of a short course of traditional acupuncture compared with usual care for persistent non-specific low back pain. *British Medical Journal* 2006; 333:623.
11. Haake M, Müller H-H, Schade-Brittinger C, Basler HD, Schäfer H, Maier C, Endres HG, Trampisch HJ, Molsberger A. German Acupuncture Trials (GERAC) for Chronic Low Back Pain Randomized, Multicenter, Blinded, Parallel-Group Trial With 3 Groups. *Archives of Internal Medicine* 2007; 167:1892-8.
12. Martínez Pecino F, Solá Arnau I, Nishishinya Aquino MB. Eficacia de la acupuntura en el dolor lumbar y en el dolor agudo en diferentes situaciones. Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía; Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo 2007; 51.
13. Pomeranz, B. Bases científicas de la acupuntura. En: Stux G y Pomeranz B, (ed.) *Fundamentos de acupuntura*. Barcelona: Springer 2000; 7-74.
14. Lau WK, Lau YM, Zhang HQ, Wong SC, Bian ZX. Electroacupuncture versus celecoxib for neuropathic pain in rat SNL model. *Neuroscience* 2010; 170:655-61.
15. Norrbrink C, Lundeberg T. Acupuncture and massage therapy for neuropathic pain following spinal cord injury: an exploratory study. *Acupuncture in Medicine* 2011. 29:108-15.
16. Heutink M, Post MW, Wollaars MM, van Asbeck FW. Chronic spinal cord injury pain: pharmacological and non-pharmacological treatments and treatment effectiveness. *Disability and Rehabilitation* 2011; 33:433-40.
17. Irnich D, Winklmeier S, Beyer A, Peter K. [Electric stimulation acupuncture in peripheral neuropathic pain syndromes. Clinical pilot study on analgesic effectiveness]. *Schmerz* 2002; 16:114-20.
18. Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Redefinition of neuropathic pain and a grading system for clinical use: consensus statement on clinical and research diagnostic criteria. *Neurology* 2008; 70:1630-5.
19. Pérez Molina I, Ayuga Loro F. Dolor neuropático. *SESCAM. Boletín farmacoterapéutico* 2008; 4:5-8.
20. Vijay V, Atul B, Gregory L, Frank C. Transforaminal epidural steroid injections in lumbosacral radiculopathy: a prospective randomized study. *Spine* 2002; 27:11-5.
21. Benoist M. The natural history of lumbar disc herniation and radiculopathy. *Joint Bone Spine* 2002; 69:155-60.
22. Rodríguez MJ, García AJ. Costes del dolor neuropático según etiología en las Unidades del Dolor en España. *Revista de la Sociedad Española del Dolor* 2007; 6:404-415.
23. Humbría A, Ortiz A, Carmona L. Lumbalgia en la población adulta española. En: *Estudio EPISER. Prevalencia e impacto de las enfermedades reumáticas en la población adulta española*. Madrid: MSD y Sociedad Española de Reumatología 2001; 39-52.
24. Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, Koeppe RA, Stohler CS, Goldman D. COMT val158met Genotype affects μ -Opioid Neurotransmitter Responses to a Pain Stressor. *Science* 2003; 1240-3.

25. Rakvåg TT, Klepstad P, Baar C, Kvam TM, Dale O, Kaasa S, Krokan HE, Skorpen F. The val158met polymorphism of the human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene may influence morphine requirements in cancer pain patients. *Pain* 2005; 116:73-8.
26. Kögel B, De Vry J, Tzschentke TM, Christoph T. The antinociceptive and antihyperalgesic effect of tapentadol is partially retained in OPRM1 (μ -opioid receptor) knock-out mice. *Neurosci Lett.* 2011 ;491(2):104-7.
27. Ahsin S, Saleem S, Bhatti AM, Iles RK, Aslam M. Clinical and endocrinological changes after electro-acupuncture treatment in patients with osteoarthritis of the knee. *Pain* 2009; 147:60-6.
28. Sociedad Española del Dolor. Recomendaciones de la Sociedad Española del Dolor para el dolor neuropático, 13/07/2009. Disponible en: <http://www.sed.es>
29. Council for international organizations of medical sciences (CIOMS). Pautas Internacionales para la Evaluación Ética de los Estudios Epidemiológicos (International Guidelines for Ethical Review of Epidemiological Studies). Ginebra 1991.
30. 59ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Seúl 2008.
31. Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la biología y la medicina. Oviedo, 4 de abril de 1997.
32. BOE núm. 159. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. Madrid 2007.
33. BOE núm. 298. LEY ORGÁNICA 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Madrid 1999.
34. Directiva 95/46/ce del parlamento europeo y del consejo relativa a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos. Luxemburgo, 24 de octubre de 1995.
35. Ernst E, White AR. Acupuncture for back pain: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of Internal Medicine* 1998; 158:2235-41.
36. Ezzo J, Berman B, Hadhazy VA, Jadad AR, Lao L, Singh BB. Is acupuncture effective for the treatment of chronic pain? A systematic review. *Pain* 2000; 86:217-25.

Efecto modulador del estrés social: Diferencias entre dolor visceral y somático

González-Cano R, Vincent K, Cobos EJ,
Coderre TJ, Baeyens JM, Cerveró F,
Pitcher MH

Resumen

Introducción: Las respuestas comportamentales de dolor visceral en ratones pueden estar moduladas por la presencia de un ratón extraño (1), pero se desconoce cómo afecta a modelos de dolor somático.

Material y Métodos: Evaluamos ratones CD-1 machos, tanto de manera aislada como en presencia de un ratón con el que no habían tenido contacto previo (extraño) en los modelos viscerales de contorsiones por ácido acético e instilación intracolónica por capsaicina y en los modelos somáticos de formalina y capsaicina intraplantar. Las respuestas comportamentales fueron registradas según los procedimientos estándar detallados en la literatura.

Resultados: Los ratones evaluados en el modelo del ácido acético mostraban un menor número de contorsiones en presencia de un ratón extraño que cuando se evaluaron de forma aislada. De igual forma, los ratones tratados con capsaicina intracolónica presentaron un menor número de lamidos abdominales cuando un ratón extraño estaba presente. Sin embargo, en los modelos de dolor somático (capsaicina intraplantar y formalina) la presencia del ratón no familiar no modificó el tiempo de respuesta.

Conclusión: El dolor visceral se considera un dolor más emocional y con un mayor componente afectivo que el dolor somático. La presencia de un extraño potencialmente peligroso puede ser más ansiogénico durante el dolor visceral resultando en una mayor analgesia inducida por estrés. Esta modulación social sería un factor importante a tener en cuenta al trabajar en modelos de dolor con roedores.

Introducción

El estrés altera la expresión de los comportamientos nociceptivos, debido en parte a la naturaleza del estresor y por otro lado, al estado afectivo del sujeto. Considerando que el dolor visceral produce una mayor respuesta emocional que un dolor

cutáneo de igual intensidad, es de suponer que ratones con dolor visceral serán mas susceptibles a un estrés social moderado que aquellos que sufren dolor somático. Hemos observado el comportamiento de diferentes ratones frente a estímulos dolorosos viscerales o somáticos, producidos por un mismo alógeno. Comparados con ratones evaluados de manera aislada, la presencia de un ratón extraño en un cubículo adyacente en una típica caja de evaluación transparente produce una reducción de los comportamientos dolorosos en los modelos de dolor visceral, pero no en los modelos somáticos evaluados.

Las interacciones entre dolor, emoción y estrés son altamente reconocidas por su elevada relevancia clínica (2-3). El dolor visceral presenta una mayor valencia emocional que el dolor cutáneo (4). En humanos, el dolor visceral presenta un mayor nivel de desagrado y ansiedad comparado con el dolor somático frente a estímulos de igual intensidad (5-6). La mera presencia de un observador puede modular como los humanos perciben y expresan el dolor (7). Los ratones, al igual que los humanos, también están influenciados por la modulación social, pudiendo esta provocar un aumento o reducción de sus respuestas comportamentales dolorosas (8). Nos planteamos, dado que el dolor visceral produce una mayor alteración de los estados afectivos que el dolor somático, los ratones con dolor visceral podrían ser también mas susceptibles a un estrés social que los ratones con dolor somático.

Material y métodos

ANIMALES

Para los experimentos se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1 (Charles River, Barcelona, España), con un peso comprendido entre 25-30 g. Los animales fueron seleccionados para los experimentos al azar durante todo el ciclo estral. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas: ciclo 12/12-horas luz/oscuridad, temperatura constante (22 ± 2 °C), con acceso *ad libitum* al agua y alimento. Las pruebas comportamentales se realizaron durante la fase de luz (9:00-15:00 horas). El cuidado de los animales se realizó siguiendo la normativa institucional (Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Granada, Granada, España) y las normas internacionales (Directiva 86/609 de la Comunidad Europea).

FÁRMACOS Y ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

Se utilizaron los antagonistas opioides naloxona clorhidrato (1 mg/kg; Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) y naloxona metiodida (2 mg/kg; Sigma-Aldrich Química S.A.) para evaluar la implicación del sistema opioide.

Capsicina (Sigma-Aldrich Química S.A.) fue disuelta en dimetil sulfoxido al 1% (DMSO; Merck KGaA, Darnstadt, Alemania) y en suero salino esteril hasta una concentración final de 0,05 µg/µl (0,005% p/v). Concentraciones superiores de capsicina fueron preparadas a partir de una solución madre al 1% (p/v) disuelta en etanol al 10% (Panreac Química S.A., Barcelona, España), 10% Tween 80 (Sigma-Aldrich Química S.A.) y 80% suero fisiológico. La solución de formalina se preparó a partir de una solución stock de formaldehído al 38% (Panreac, S.A., España) diluyendola en suero fisiológico para obtener la concentración adecuada. El ácido acético (Sigma-Aldrich Química S.A.) fue disuelto en agua ultrapura para obtener una concentración del 0,9%. Todas las soluciones fueron preparadas antes de los experimentos.

EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL

Los animales fueron evaluados en compartimentos aislados (7 x 7 x 13 cm). En la condición «solitario», no había ningún otro ratón cerca de la plataforma de evaluación. En la condición «extraño», un ratón de otra caja diferente al ratón a evaluar, con el que este no había tenido contacto previo se sitúa en el compartimento adyacente durante la duración del periodo de habituación y del experimento. Pasados los 30 min del periodo de habituación, los animales a evaluar fueron inyectados con la correspondiente solución de fármaco y evaluados en el correspondiente modelo. Cada animal se usó solo una vez.

MODELOS VISCERALES

Los modelos de capsicina intracolónica y de ácido acético fueron usados como modelos de dolor visceral. En el modelo de capsicina intracolónica, se aplicó vaselina en la zona perianal para evitar la estimulación de zonas somáticas al contacto con la capsicina. La solución de capsicina (50 µl) se administró mediante la inserción de una fina cánula (0,61 mm; 4 cm largo) en el colon a través del ano. El ratón fue devuelto a su compartimento y se registraron las respuestas relacionadas con el dolor visceral agudo (lamidos, estiramientos y contracciones del abdomen) durante los siguientes 20 minutos.

En el modelo del ácido acético se inyectó ácido acético (0,9%) de manera intraperitoneal (10 ml/kg) y se registró el número de contorsiones durante 30 min.

MODELOS SOMÁTICOS

Como modelos somáticos se usaron el modelo de la formalina y el modelo de la capsicina intraplantar. En el modelo de la capsicina intraplantar, 20 µl de cap-

saicina (0,005%, 0,01% o 0,1%) fueron inyectados en la pata trasera mediante una micro jeringa Hamilton 1710 TLL con una aguja de 30-g. Se registró el tiempo de lamido de la pata inyectada durante 15 min tras la inyección de capsaicina. El procedimiento usado para el test de formalina fue similar al de capsaicina. Se administró 20 μ l de formalina (1% o 2,5%) y se registró el tiempo de lamido de la pata inyectada.

ANÁLISIS DE DATOS

Cada punto de las gráficas o la altura de las barras y las líneas verticales que parten de ellos/as representan respectivamente la media $\pm$ E.S.M. de los valores.

Las medias fueron comparadas estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías dependiendo del experimento. Para ambos casos, se aplicó el post-test de Bonferroni. Los datos fueron analizados con el programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Las diferencias entre valores fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el P-valor fue inferior a 0,05.

Resultados

La presencia de un ratón «extraño», localizado en un cubículo transparente contiguo al compartimento de evaluación produjo, en el ratón evaluado, una disminución de las respuestas comportamentales indicativas de dolor visceral producidas por la capsaicina intracolónica (Fig. 1A). Específicamente, estos ratones mostraron una reducción de un 52% o 42% en los comportamientos dolorosos producidos por la administración intracolónica de capsaicina al 0,01% o 0,1% respectivamente. Posteriormente se evaluó como puede influir el estrés social en la respuesta comportamental tras un estímulo doloroso somático. A diferencia de la alta reducción observada en el modelo visceral (capsaicina intracolónica), la presencia de un ratón «extraño» no alteró las respuestas comportamentales producidas por la administración cutánea (intraplantar) de la misma concentración de capsaicina evaluada anteriormente en el modelo visceral (Fig. 1B), lo que sugiere que la estimulación visceral nociva con capsaicina emplea preferentemente circuitos del sistema nervioso central regulados por sistemas de analgesia inducida por el estrés. Los opioides endógenos juegan un papel principal en la analgesia inducida por estrés (3), por ello supusimos que el bloqueo de los receptores opioides en el sistema nervioso central podría revertir los comportamientos dolorosos suprimidos por la analgesia inducida por estrés. Para probar si estos efectos anti-nociceptivos son mediados por opioides, los ratones fueron inyectados 30 min antes de la prueba con naloxona clorhidrato, antagonista de receptor opioide o su derivado cuaternario naloxona metiodida. En los ratones a los que se administró capsaicina intracoló-

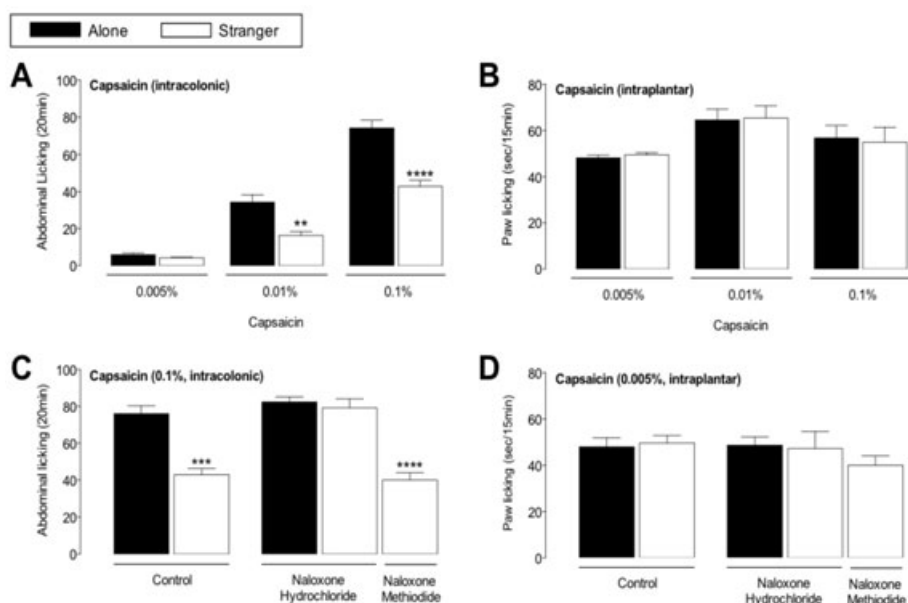


FIGURA 1. El estrés social produce analgesia mediada por opioides tras un estímulo doloroso visceral pero no tras el mismo estímulo doloroso aplicado de manera somática.

a) La presencia de un individuo de la misma especie con el que no se ha tenido trato previo (extraño) en un compartimento transparente adyacente al compartimento de evaluación, provoca un estrés en el animal evaluado capaz de reducir significativamente los comportamientos dolorosos provocados por la capsicina intracolónica. b) Las mismas concentraciones de capsicina, aplicadas de manera subcutánea (intraplantar) produjeron comportamientos dolorosos, que no fueron alterados por la presencia del extraño. c) La inyección sistémica del antagonista opioide naloxona clorhidrato redujo la analgesia producida por el extraño, pero no así el antagonista naloxona metiodida, incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica. d) Naloxona clorhidrato no produjo ningún efecto en las respuestas producidas por la inyección subcutánea de capsicina. ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$

nica 0,1%, la pre-inyección subcutánea de naloxona metiodida (incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica) no pudo revertir la supresión de comportamientos nociceptivos producidos por el estrés social. Sin embargo, naloxona clorhidrato (que si es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica) revirtió completamente la anti-nocicepción inducida por el estrés social (Fig. 1C). Por otro lado, ni la na-

loxona clorhidrato ni la naloxona metiodida, modificaron las respuestas dolorosas tras la administración de capsaicina intraplantar (Fig. 1D). El estrés social, por lo tanto, parece producir una anti-nocicepción endógena inducida por opioides que ocurre en el sistema nervioso central específicamente durante la estimulación con capsaicina visceral pero no mediante su administración cutánea.

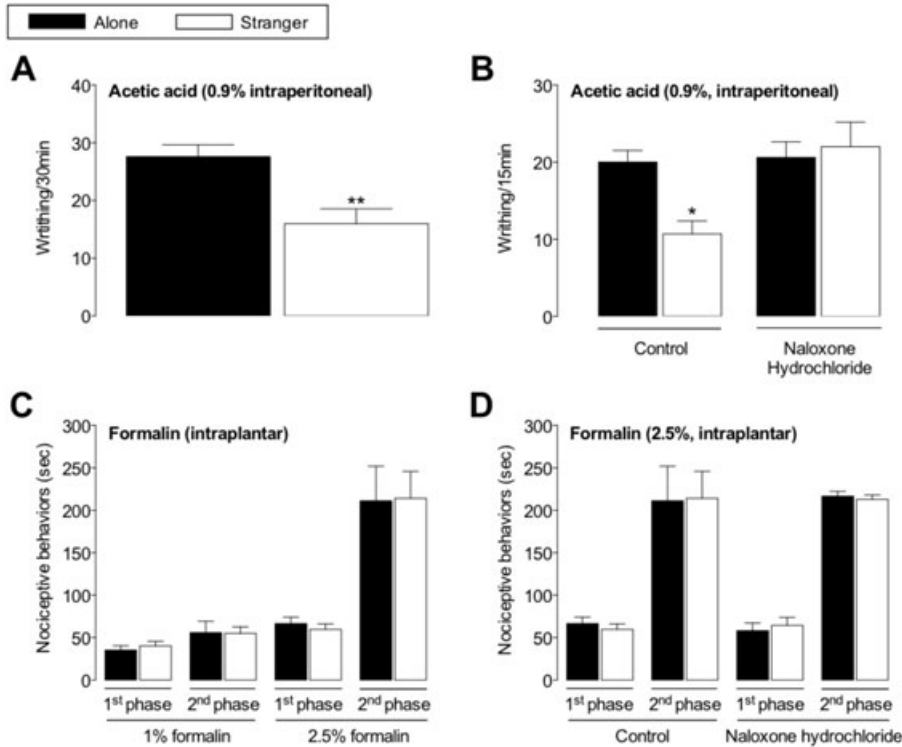


FIGURA 2. El estrés social produce analgesia mediada por opioides tras la aplicación de ácido acético intraperitoneal, pero no tras la inyección de formalina intraplantar.

a) Comparados con los ratones evaluados de manera aislada, la presencia de un ratón extraño produce una reducción del número de respuestas dolorosas tras la administración de ácido acético intraperitoneal. b) Estos comportamientos dolorosos provocados por el ácido acético pueden ser revertidos por naloxona clorhidrato. c) El estrés social no muestra efecto en las respuestas dolorosas provocadas por la formalina intraplantar en ninguna de las dosis evaluadas (1% o 2,5%). d) Naloxona clorhidrato no mostró ningún efecto en las respuestas producidas por la formalina intraplantar.

** $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

A continuación se trató de determinar si el estrés social produce resultados comparables en otros modelos de dolor visceral o cutáneo. Similar a Langford et al. (8), hemos empleado la prueba de ácido acético, un modelo de dolor visceral en el que se cuantifican durante 30 min el número de constricciones abdominales producidas por la inyección de ácido acético diluido. Similar a nuestros resultados con capsaicina intracolónica, encontramos que el número de constricciones abdominales fue fuertemente reducido por la presencia de un extraño (Fig. 2A), los ratones tratados con ácido acético que experimentan estrés social producen 41% menos comportamientos dolorosos que los ratones evaluados de manera aislada. Una vez más, de manera similar a la capsaicina intracolónica, naloxona clorhidrato revirtió completamente la anti-nocicepción inducida por el estrés social en el modelo del ácido acético (Fig. 2B). La prueba de la formalina, otro modelo ampliamente utilizado para la evaluación de dolor agudo cutáneo, evoca un patrón bifásico de conductas nociceptivas que dura aproximadamente 40 minutos en ratones. Hemos probado dos dosis de uso común, ya sea el 1% o 2,5% de formalina, inyectada de manera intraplantar. Al igual que con la inyección intraplantar de capsaicina, los comportamientos nociceptivos debidos a la formalina intraplantar (1% o 2,5%) se mantuvieron sin cambios por la presencia de un extraño (Fig. 2C), así como tras la administración de naloxona clorhidrato (Fig. 2D).

Discusión

Hemos demostrado que el estrés social suprime comportamientos nociceptivos asociados al dolor visceral por medio del sistema opioide al igual que ocurre en situaciones de estrés más graves (9). Es importante destacar que el estrés social no suprimió los comportamientos dolorosos cuando estos fueron producidos por estímulos somáticos, lo que sugiere que el origen visceral de estimulación nociva es clave. En concreto, la supresión inducida por el estrés social de los comportamientos dolorosos se revirtieron con naloxona clorhidrato (capaz de atravesar la barrera hematoencefálica) pero no con naloxona metiodida (incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica).

Una apariencia saludable puede significar la diferencia entre la vida y la muerte de especies presa como los ratones. Por ello, Williams (10) sugiere que la supresión o la expresión del comportamiento doloroso puede otorgar beneficios de supervivencia en diferentes circunstancias. Por ejemplo, mientras que la expresión del dolor puede contribuir a la supervivencia a través del apoyo del grupo familiar, la supresión del comportamiento doloroso puede ser ventajoso para evitar conflictos jerárquicos o depredadores. Hemos demostrado que, en comparación con ratones con dolor cutáneo, los ratones que experimentan dolor visceral son particularmente susceptibles a la analgesia opioide-dependiente ante la presencia de un extraño. Curiosamente, el tipo de irritante no parece ser un factor crítico, ya que, en el caso

de la capsaicina, cambiar la vía de administración es suficiente para evocar diferentes respuestas al estrés social, a pesar de utilizar concentraciones idénticas. El dolor visceral y somático se procesan a través de diferentes vías en el sistema nervioso central, evocando la activación de distintas áreas del cerebro implicadas en la regulación de las respuestas al estrés, la ansiedad y el estado de ánimo (5,11). Como tal, el dolor visceral es capaz de provocar estados emocionales negativos que alteran la reactividad al estrés; es bien conocido que los pacientes con trastornos gastrointestinales funcionales tienen niveles desproporcionadamente altos de comorbilidades psicológicas como la ansiedad y depresión (12-13). Además, el dolor visceral se considera más emocional que el dolor cutáneo, así como capaz de producir una mayor respuesta autónoma (4). Sin embargo, el estado emocional a través del cual filtrar nuestras interpretaciones del entorno social puede tener efectos importantes en los resultados.

Durante la evaluación comportamental de roedores es común que múltiples roedores se observen simultáneamente durante la medida de los comportamientos nociceptivos. De hecho, las cajas de prueba disponibles en el mercado están diseñadas para el ensayo de múltiples roedores a la vez. Teniendo en cuenta el creciente número de estudios sobre el dolor utilizando roedores (14) y el papel crítico que juegan estas pruebas nociceptivas en el desarrollo analgésico preclínico (15), tener en cuenta la modulación social del dolor en la metodología experimental es fundamental para obtener resultados fiables. Por lo tanto, nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de los procedimientos en las pruebas de comportamiento que deben ser comparables a las empleadas en los estudios clínicos. En concreto, nuestros resultados apoyan la minimización de las fuentes sutiles de estrés social, limitando los estímulos visuales, y quizás también los contactos auditivos / olfativos entre los ratones durante las pruebas nociceptivas, sobre todo en los modelos viscerales.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por la Junta de Andalucía (grupo CTS-109), CIHR operating grant (DOP73908) y el Ministerio Español de Ciencia e Innovación (mediante una beca de Formación de Profesorado Universitario a R. González-Cano).

Referencias

1. Langford DJ, Cragger SE, Shehzad Z, Smith SB, Sotocinal SG, Levenstadt JS, Chanda ML, Levitin DJ, Mogil JS. 2006. Social Modulation of Pain as Evidence for Empathy in Mice. *Science*. 312: 1967-1970.
2. Jennings EM, Okine BN, Roche M, Finn DP. 2014. Stress-induced hyperalgesia. *Prog Neurobiol*.

3. Butler RK, Finn DP. 2009. Stress-induced analgesia. *Progr Neurobiol.* 88:184–202.
4. Robinson DR, Gebhart GF. 2008. Inside information – The unique features of visceral sensation. *Molecular Interventions.* 8(5): 242–253.
5. Strigo IA, Duncan GH, Boivin M, Bushnell MC. 2003. Differentiation of visceral and cutaneous pain in the human brain. *J Neurophysiol.* 89:3294-3303.
6. Strigo IA, Bushnell MC, Boivin M, Duncan GH. 2002. Psychophysical analysis of visceral and cutaneous pain in human subjects. *PAIN.* 97:235-246.
7. Master SL, Eisenberger NI, Taylor SE, Naliboff BD, Shirinyan D, Lieberman MD. 2009. A Picture's Worth: Partner Photographs Reduce Experimentally Induced Pain. *Psychological Science.* 20: 1316-1318.
8. Langford DJ, Tuttle AH, Briscoe C, Harvey-Lewis C, Baran I, Gleeson P, Fischer DB, Buonora M, Sternberg WF, Mogil JS. 2011. Varying Perceived Social Threat Modulates Pain Behavior in Male Mice. *J Pain.* 12(1): 125-132.
9. Lester LS, Fanselow MS. 1985. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. *Behav Neurosci.* 99:756-759.
10. Williams A C. De C. 2002. Facial expression of pain: An evolutionary account. *Behavioral and Brain Sciences.* 25: 439-488.
11. Grundy D, Al Chaer ED, Aziz Q, Collins SM, Ke M, Taché Y, Wood JD. (2006). Fundamentals of neurogastroenterology: Basic science. *Gastroenterology.* 130:1391-1411.
12. Walker EA, Roy-Byrne PP, Katon WJ. 1990. Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illness. *Am J Psychiatry.* 147(5): 565-572.
13. Roy-Byrne PP, Davidson KW, Kessler RC, Asmundson GJG, Goodwyn RD, Kubzansky L, Lydiard RB, Massie MJ, Katon W, Laden SK, Stein MB. 2008. Anxiety disorders and comorbid medical illness. *Gen Hosp Psychiatry.* 30:208-225.
14. Mogil JS, Simmonds K, Simmonds MJ. 2009. Pain research from 1975 to 2007: A categorical and bibliometric meta-trend analysis of every research paper published in the journal *Pain.* *PAIN.* 142:48–58
15. Negus S, Vanderah TW, Brandt MR, Bilsky EJ, Becerra L, Borsook D. 2006. Preclinical Assessment of Candidate Analgesic Drugs: Recent Advances and Future Challenges. *J Pharmacol Exp Therap.* 319(2): 507-514.



Diferencias de la analgesia opioide periférica frente a estímulos térmicos y mecánicos

Montilla-García A, Sánchez-Fernández C,
Cobos EJ, Baeyens JM.

Resumen

Introducción: las vías de transmisión del dolor para estímulos mecánicos y térmicos son diferentes y se desconoce si los opioides producen analgesia frente a los dos tipos de estímulos por los mismos mecanismos. El principal objetivo de este estudio fue evaluar el efecto analgésico de agonistas opioides μ con distinta actividad intrínseca utilizando ambos tipos de estímulo, así como determinar la contribución de los receptores opioides periféricos en dicha analgesia.

Material y métodos: Se utilizaron ratones hembras de la cepa CD-1. La analgesia frente al estímulo mecánico y térmico fue evaluada como incremento de la latencia de respuesta en el test de presión de la pata (estímulo mecánico de 450 g) y en la placa caliente unilateral (placa a 55 °C), respectivamente.

Resultados: morfina, oxycodona o buprenorfina, administrados sistémicamente, produjeron efectos antinociceptivos de manera dosis dependiente frente a ambos tipos de estímulos, aunque produjeron en todos los casos una mayor analgesia frente al estímulo térmico que al mecánico. La analgesia inducida por estos agonistas opioides fue revertida completamente, y en ambas modalidades sensoriales, por el antagonista opioide naloxona. Sin embargo, la antinocicepción opioide frente al estímulo térmico fue mucho más sensible a los efectos de naloxona metiodida (un antagonista opioide carente de penetrabilidad central) que los efectos frente al estímulo mecánico, lo que apunta a un papel más relevante de los receptores opioides periféricos en la antinocicepción opioide frente a estímulos térmicos. De hecho, la administración local (intraplantar) de los tres opioides evaluados produjo una marcada analgesia frente al estímulo térmico, mientras que no indujo efecto alguno frente al estímulo mecánico.

Conclusión: la analgesia opioide periférica depende del tipo de estimulación sensorial, siendo mucho más prominente en el dolor de tipo térmico que mecánico.

Introducción

Los opioides, particularmente los agonistas del subtipo μ (tales como morfina, oxicodona y buprenorfina), son muy utilizados en clínica como analgésicos [10]. Los receptores opioides μ se expresan en distintos lugares de las vías del dolor, tanto el sistema nervioso central (médula espinal y sobre todo a nivel supraespinal) como en el sistema nervioso periférico (ganglios de la raíz dorsal y terminales nerviosas periféricas) [3]. Pese a su localización, tanto estudios clínicos [p. ej. 17] como preclínicos [2, 3, 13] sugieren que el efecto analgésico de la administración sistémica de agonistas opioides μ se produce principalmente a nivel central, y que la contribución periférica es muy limitada.

De hecho, hemos descrito recientemente que la analgesia opioide frente a estímulos mecánicos tras la administración sistémica de estos fármacos es poco sensible al antagonismo de los receptores opioides periféricos por naloxona metiodida (un antagonista opioide con escasa penetrabilidad central) [13]. Los receptores opioides μ periféricos se encuentran principalmente en nociceptores no mielinizados peptidérgicos [14, 19], los cuales codifican principalmente para los estímulos de naturaleza térmica [1]. Por lo tanto, el tipo de estimulación sensorial evaluada podría ser determinante en la analgesia opioide periférica. Sin embargo, no se han realizado previamente estudios comparando la contribución de los receptores opioides periféricos a la analgesia inducida por la administración sistémica de opioides clínicamente relevantes frente a estímulos mecánicos y térmicos, o los posibles efectos analgésicos locales de dichos opioides.

En base a estos antecedentes, los principales objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto analgésico de agonistas opioides μ en el ratón utilizando dos modalidades sensoriales diferentes (estímulo mecánico y térmico), así como determinar la contribución de los receptores opioides periféricos en dicha analgesia.

Material y métodos

ANIMALES

Para los experimentos se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1 (Charles River, Barcelona, España), con un peso comprendido entre 25-30 g. Los animales fueron seleccionados para los experimentos al azar durante todo el ciclo estral. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas: ciclo 12/12-horas luz/oscuridad, temperatura constante (22 ± 2 °C), con acceso *ad libitum* al agua y alimento. Las pruebas comportamentales se realizaron durante la fase de luz (9:00-15:00 horas) y al azar a lo largo del ciclo estral. El cuidado de los animales se realizó siguiendo la normativa institucional (Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Granada, Granada, España) y las normas internacionales (Directiva 86/609 de la Comunidad Europea).

FÁRMACOS Y ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

Los fármacos opioides (y sus proveedores) fueron los siguientes: el agonista opioide μ morfina clorhidrato (Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad de España), oxicodona clorhidrato y buprenorfina clorhidrato (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España). Para determinar la contribución de los receptores opioides periféricos en los efectos de estos agonistas opioides, realizamos experimentos en los que asociamos la administración de estos fármacos con los antagonistas opioides naloxona metiodida (carente de penetrabilidad central) y de naloxona clorhidrato (que actúa tanto a nivel periférico como central) (Sigma-Aldrich Química SA). Todos los fármacos se disolvieron en solución salina fisiológica estéril (0.9% NaCl). Para evaluar los efectos de los tratamientos sistémicos, los fármacos o sus solventes fueron administrados subcutáneamente (s.c.) en la zona interescapular en un volumen de 5 mg/kg. Para evaluar los efectos locales (pata ipsilateral) de los tratamientos, los fármacos o sus solventes fueron administrados localmente mediante administraciones intraplantares (i.pl.) en un volumen de 20 μ L, utilizando una microjeringa 1710 TLL Hamilton (Teknokroma, Barcelona, España) con una aguja de calibre 30G x 1/2". Cuando los agonistas opioides se asociaron con los antagonistas, cada fármaco se administró en una zona distinta del área interescapular.

Para estudiar los efectos de los tratamientos con los agonistas opioides sistémicos, las soluciones de morfina y oxicodona se administraron 30 minutos antes de la estimulación de la pata, mientras que la buprenorfina se administró subcutáneamente una hora antes de la evaluación, ya que se ha descrito previamente que sus efectos analgésicos se producen con una latencia superior a la de otros opioides [20]. Para estudiar la contribución de los receptores opioides periféricos en dicha analgesia opioide, los antagonistas opioides naloxona o naloxona metiodida (o salino) se administraron subcutáneamente 5 minutos antes del agonista μ . En los experimentos en los que se explora el efecto de la administración local de los agonistas opioides, y con el objeto de minimizar los posibles efectos sistémicos de los tratamientos, los animales fueron evaluados 5 minutos después de la inyección i.pl.

EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL

Procedimientos generales: los animales fueron habituados durante una hora en la habitación de evaluación antes de comenzar los experimentos. Los procedimientos de manipulación y evaluación de los animales frente al estímulo mecánico y térmico fueron semejantes, para una mejor comparación de los resultados obtenidos utilizando las diferentes modalidades sensoriales. Brevemente, los ratones fueron sostenidos suavemente por la piel de la zona superior de la región interescapular, para ser sometidos de manera alterna en cada una de las patas traseras al estímulo sensorial, dejando un minuto entre medidas. Como indicador de dolor se utilizó la latencia de aparición de la respuesta comportamental (forcejeo y reti-

rada de la pata para la estimulación mecánica y térmica, respectivamente) tras el inicio de la estimulación sensorial. Las condiciones experimentales específicas de cada test se describen más adelante. En ambos casos se estableció un tiempo de corte de 50 s para minimizar la posibilidad de daño tisular. Los animales se evaluaron únicamente frente un tipo de estímulo.

Evaluación de la nocicepción mecánica (test de presión de la pata): para la evaluación de los efectos de los fármacos frente al estímulo mecánico se utilizó un analgesímetro de presión (modelo 37215; Ugo-Basile, Varese, Italia), estimulando la pata trasera con estructura cónica con la punta roma y a una intensidad de 450 g hasta la aparición de la reacción de forcejeo [7, 12].

Evaluación de la nocicepción térmica (test de la placa caliente unilateral): para la evaluación de los efectos de los fármacos frente al estímulo térmico se utilizó una placa caliente (analgesímetro modelo PE34, Series 8, IITC Life Science Inc.; Los Angeles, EEUU), programada a una temperatura de 55 ± 1 °C [6].

La intensidades de las estimulaciones mecánica (450 g) y térmica (55 °C) fueron escogidas en base a que en nuestras condiciones experimentales ambas producen una latencia de respuesta similar (ver sección de Resultados).

ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis de los resultados obtenidos con los tratamientos sistémicos (s.c.) se realizó el promedio de las medias de los dos valores obtenidos para cada pata trasera. Sin embargo, para el análisis de los resultados obtenidos utilizando los tratamientos locales (i. pl.), se realizó de forma independiente el promedio de los dos valores obtenidos en cada pata trasera (ipsilateral y contralateral al tratamiento). Las medias fueron comparadas estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías dependiendo del experimento. Para ambos casos, se aplicó el post-test de Bonferroni. Los datos fueron analizados con el programa Sigma-Plot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Las diferencias entre valores fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el P-valor fue inferior a 0,05.

Resultados

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA (SUBCUTÁNEA) DE LOS AGONISTAS DE RECEPTORES OPIOIDES μ EN LA NOCICEPCIÓN MECÁNICA Y TÉRMICA

La antinocicepción mecánica inducida por la administración s.c. de opioides μ se midió como el aumento de la respuesta de latencia de forcejeo cuando se aplicó una presión constante (450 g) en la pata trasera de los ratones, con respecto a la

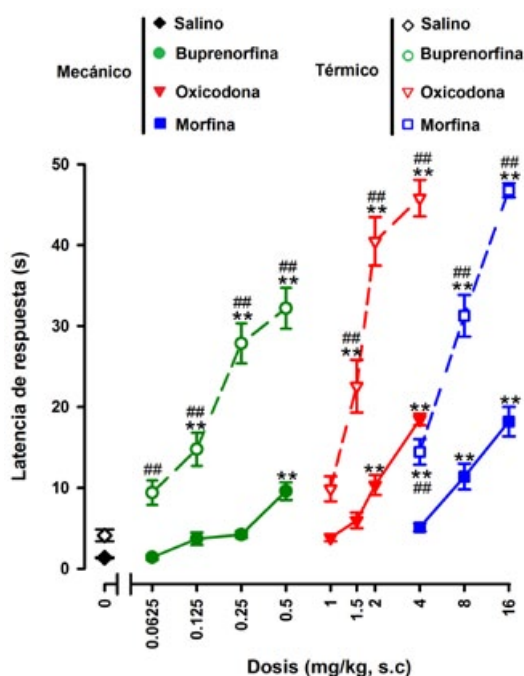


FIGURA 1. Comparación de la analgesia inducida por la administración subcutánea (s.c.) de varias dosis de agonistas opioides μ frente al estímulo mecánico (presión de 450 g) y térmico (55 °C).

Diferencias significativas entre los valores de los animales tratados con los opioides y su solvente (dosis 0), evaluados frente al mismo estímulo: ** P < 0,01; y entre los valores de los animales tratados con las mismas dosis del opioide y evaluados frente al estímulo mecánico y térmico: ## P < 0,01.

latencia de respuesta de los ratones tratados con el solvente de los fármacos. La antinocicepción térmica se midió como el aumento de la latencia de retirada de la pata en los ratones tratados con los fármacos, con respecto a los ratones tratados con su solvente cuando se aplicó una temperatura constante (55 °C) en la pata trasera. La latencia de la respuesta de animales control fue similar frente al estímulo mecánico ($1,36 \pm 0,06$ s) como al térmico ($4,12 \pm 0,73$ s) (dosis 0 en la Fig. 1, símbolo cerrado y abierto respectivamente).

La administración subcutánea de la buprenorfina (0,0625-0,5 mg/kg) evocó un efecto antinociceptivo estadísticamente significativo frente al estímulo mecánico tan sólo a la dosis más alta administrada (Fig. 1, símbolos cerrados). La administración sistémica de los agonistas opioides oxycodona (1-4 mg/kg) y morfina (4-16

mg/kg) indujo un efecto antinociceptivo frente al estímulo mecánico de manera dosis dependiente (Fig. 1, símbolos cerrados).

Para comparar el efecto de estos fármacos en el dolor inducido por el estímulo mecánico con el estímulo térmico, utilizamos las mismas dosis de los agonistas opioides en ambas modalidades sensoriales. Como se muestra en la Fig. 1, los efectos de los agonistas μ evaluados frente al estímulo térmico fueron marcadamente superiores que frente al estímulo mecánico. De hecho, la administración subcutánea de buprenorfina indujo un efecto antinociceptivo estadísticamente significativo en todo el rango de dosis evaluado, y las dosis más altas de oxicodona y morfina indujeron en los animales incluso latencias de respuesta próximas al tiempo de corte (50 s) (Fig. 1, símbolos abiertos). Por lo tanto, la administración sistémica de agonistas opioides μ induce efectos antinociceptivos el ratón cuya intensidad depende del tipo de estimulación sensorial empleada, siendo mayor la antinocicepción térmica que la mecánica.

CONTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES OPIOIDES PERIFÉRICOS EN LA ANTINOCICEPCIÓN MECÁNICA Y TÉRMICA INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE VARIOS AGONISTAS μ

Para entender el papel de los receptores opioides periféricos en la antinocicepción mecánica y térmica inducida por analgésicos opioides μ , evaluamos la sensibilidad de esta antinocicepción frente a naloxona metiodida, un antagonista opioide cuya actuación se limita a la periferia. La latencia de respuesta frente al estímulo mecánico o térmico aumentó notablemente en animales tratados s.c. con morfina (16 mg/kg), oxicodona (3 mg/kg) y buprenorfina (0,5 mg/kg) en comparación con ratones control, aunque como se ha descrito en el apartado anterior, este incremento fue mayor frente al estímulo térmico que frente al estímulo mecánico (Figs. 2A y B, respectivamente).

La asociación de la administración de morfina o buprenorfina con el antagonista opioide periférico naloxona metiodida (2-6 mg/kg, s.c.) no alteró el efecto de ninguno de estos agonistas opioides frente al estímulo mecánico (Fig 2A.). Sin embargo, la antinocicepción inducida por la oxicodona fue levemente revertida por la dosis más alta de este antagonista opioide (Fig. 2A). Sin embargo, la asociación de estas mismas dosis de naloxona metiodida con morfina, oxicodona o buprenorfina indujo una marcada disminución dosis dependiente del efecto antinociceptivo frente al estímulo térmico de estos tres agonistas opioides (Fig. 2B).

A diferencia de esta reversión diferencial dependiente de la estimulación sensorial en el efecto de los analgésicos opioides por naloxona metiodida, el antagonista opioide con penetrabilidad central naloxona (0,5 mg/kg, sc) fue capaz de revertir completamente el efecto antinociceptivo inducido por todos los agonistas μ tanto en la antinocicepción mecánica como térmica (Figs. 2A y B, respectivamente).

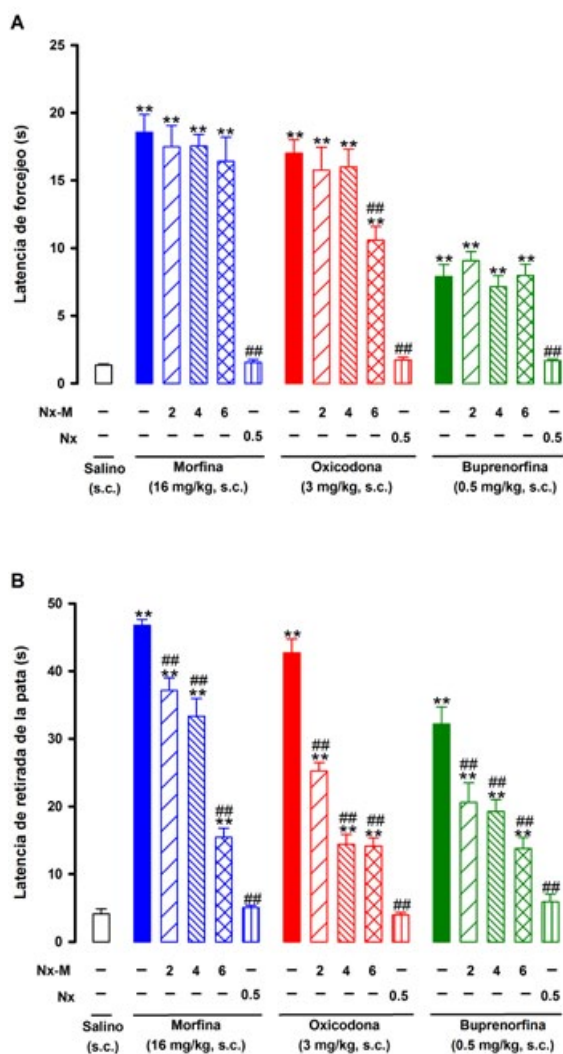


FIGURA 2. Contribución de los receptores opioides periféricos a la analgesia inducida por la administración subcutánea (s.c.) de varios agonistas opioides μ frente al estímulo mecánico (presión de 450 g) y térmico (55 °C).

Los tratamientos con los agonistas opioides fueron asociados al antagonista opioide con penetrabilidad central naloxona (Nx) o al antagonista opioide de acción periférica naloxona metiodida (Nx-M). Diferencias significativas entre animales tratados con los agonistas opioides μ y su solvente: ** $P < 0,01$; y entre animales tratados con agonistas opioides μ y su asociación con Nx o Nx-M: ## $P < 0,01$.

Estos resultados indican que la antinocicepción opioide frente al estímulo térmico es mucho más sensible al antagonismo de los receptores opioides periféricos que la antinocicepción opioide frente al estímulo mecánico.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN LOCAL (INTRAPLANTAR) DE LOS AGONISTAS DE RECEPTORES OPIOIDES μ EN LA NOCICEPCIÓN MECÁNICA Y TÉRMICA.

Dado que el efecto antinociceptivo de los agonistas opioides administrados s.c. frente al estímulo térmico parece involucrar la participación de receptores opioides periféricos en mayor medida que frente a estímulos mecánicos, estudiamos los efectos de la administración local de buprenorfina, oxicodona y morfina frente a ambas estimulaciones sensoriales.

La latencia de respuesta en los ratones tratados con el solvente de los fármacos frente al estímulo mecánico y térmico fue similar ($1,94 \pm 0,34$ y $3,93 \pm 0,41$ s, respectivamente) (dosis 0 en la Fig. 3; símbolo cerrado para el estímulo mecánico y abierto para la estimulación térmica). La administración i.pl. de los opioides buprenorfina (3,125-25 μ g), oxicodona (12,5-100 μ g) o morfina (50-200 μ g) no indujo ningún efecto antinociceptivo significativo frente al estímulo mecánico (Fig. 3 símbolos cerrados). Sin embargo, la administración i.pl. de estos mismos agonistas opioides indujo un marcado incremento en la latencia de respuesta de animales sometidos al estímulo térmico. Este efecto antinociceptivo frente al estímulo térmico se produjo de manera local, ya que la administración i.pl. con los agonistas opioides no alteró la latencia de respuesta cuando los animales fueron estimulados en la pata contralateral al tratamiento, con la excepción de la dosis más alta de oxicodona evaluada (50 μ g) que indujo un leve efecto antinociceptivo contralateral (datos no mostrados). Por lo tanto, la administración local de los agonistas opioides μ induce una clara antinocicepción térmica sin alterar el dolor frente al estímulo mecánico.

Discusión

En este estudio mostramos que el efecto analgésico inducido por distintos opioides μ (buprenorfina, oxicodona y morfina) depende del tipo de estimulación sensorial utilizado. Los efectos antinociceptivos de los tres agonistas opioides, administrados sistémicamente, son superiores frente al estímulo térmico que mecánico. Además, mientras que los efectos antinociceptivos de los agonistas opioides frente al estímulo térmico requieren de la participación de receptores opioides periféricos (sensibles al antagonismo por naloxona metiodida), estos no parecen ser tan importantes para el efecto analgésico de los agonistas μ frente al estímulo

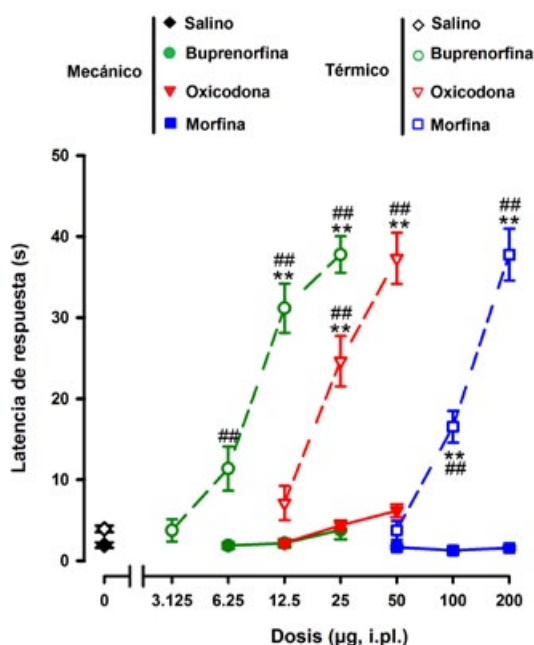


FIGURA 3. Comparación de la analgesia inducida por la administración intraplantar (i.pl.) de varios agonistas opioides μ frente al estímulo mecánico (presión de 450 g) y térmico (55 °C).

Diferencias significativas entre los valores de los animales tratados con los opioides y su solvente, evaluados frente al mismo estímulo: ** $P < 0,01$; y entre los valores de los animales tratados con las mismas dosis del opioide y evaluados frente al estímulo mecánico y térmico: ## $P < 0,01$. Ningún tratamiento produjo efecto en la pata contralateral, excepto oxidodona 50 µg frente al estímulo térmico.

mecánico. La diferencia en importancia de los receptores opioides periféricos en los efectos de los agonistas opioides frente a estímulos mecánicos y térmicos, se pone de manifiesto por el gran efecto antinociceptivo local inducido por estos fármacos frente al estímulo térmico, mientras que carecen de actividad antinociceptiva local frente al estímulo mecánico. Estos resultados no habían sido descritos previamente.

En clínica, los opioides que se utilizan con fines analgésicos son los agonistas opioides del subtipo μ [10], de ahí que para nuestro estudio hayamos seleccionado tres agonistas μ con amplio uso clínico: la morfina, la oxidodona y la buprenorfina. Son muchos los trabajos que demuestran como los opioides vía sis-

témica ejercen un efecto antinociceptivo en dolor agudo frente a distintos tipos de estimulación sensorial [8, 12, 18]. De acuerdo con estos trabajos previos, mostramos que los opioides vía sistémica actúan como analgésicos en dolor agudo frente a estímulos térmicos y mecánicos de forma dosis dependiente. Sin embargo, el efecto analgésico de los tres opioides utilizados fue considerablemente mayor frente al estímulo térmico que frente al mecánico. Cabe destacar que para la realización de este estudio, los animales han sido manipulados y evaluados frente a ambas estimulaciones sensoriales de un modo muy similar, en los que la única diferencia obvia fue el tipo de estímulo aplicado (presión plantar y placa caliente unilateral). Por lo tanto, posibles diferencias en el método de evaluación de la nocicepción frente a ambos estímulos no parecen jugar un papel relevante en los resultados obtenidos. Este estudio es el primero en el que se ha realizado una comparación de este tipo entre los efectos analgésicos de los opioides frente a diferentes estimulaciones sensoriales.

Los receptores opioides μ se expresan en el sistema nervioso central así como a nivel periférico [3, 13]. Los efectos analgésicos de los opioides se consideran tradicionalmente de origen central [2, 3, 11, 17]. Sin embargo, en los últimos años, la activación de los receptores opioides periféricos como posible herramienta para el tratamiento del dolor ha despertado un gran interés en la comunidad científica [15, 16]. En este estudio mostramos que la analgesia inducida por la administración sistémica de morfina y buprenorfina frente a estímulos mecánicos es poco sensible a la naloxona metiodida, lo que sugiere que sus efectos ocurren principalmente a nivel central. Estos datos son congruentes con uno de nuestros estudios más recientes [13]. Sin embargo, el efecto antinociceptivo de la oxicodona fue sensible al antagonista opioide periférico, aunque sólo a la dosis más alta usada en este estudio (6 mg/kg). Estos resultados concuerdan con datos clínicos y preclínicos que sugieren que parte de los efectos analgésicos de oxicodona se deben a su actuación periférica [9, 13].

A diferencia de la poca sensibilidad al antagonismo de los receptores opioides periféricos de la analgesia opioide frente al estímulo mecánico, la analgesia opioide frente al estímulo térmico muestra una gran sensibilidad a la naloxona metiodida. Por lo tanto, podemos afirmar con este estudio comparativo que la contribución de los receptores opioides periféricos a la analgesia inducida por la administración sistémica de fármacos opioides μ depende del tipo de estimulación sensorial utilizada.

Para estudiar más en profundidad la diferencia de sensibilidad del estímulo térmico y mecánico a la activación opioide periférica, realizamos administraciones i.pl. de los agonistas opioides y exploramos sus efectos frente a ambos estímulos. La administración local de buprenorfina, oxicodona o morfina produjo analgesia frente a estímulos térmicos pero no frente a estímulos mecánicos. Además, los efectos antinociceptivos de la administración i.pl. de agonistas μ frente al estímulo térmico se producen de manera local, ya que no alteran las respuestas comportamentales de los animales al ser estimulados en la pata contralateral

al tratamiento. Hasta ahora, había estudios aparentemente contradictorios ya que mientras que unos defendían la existencia del efecto analgésico local de opioides como la morfina, usando un estímulo térmico [4, 5], otros demostraban la falta de efecto local de distintos agonistas opioides usando un estímulo mecánico [12, 13]. El presente estudio muestra claramente que el tipo de estimulación sensorial juega un papel clave en la detección de efectos analgésicos locales inducidos por el agonismo μ .

Las vías de transmisión del dolor para estímulos mecánicos y térmicos son diferentes [1]. Existen subpoblaciones de nociceptores que pueden diferenciarse según los marcadores moleculares que expresan. Así pues, los nociceptores amielínicos no peptidérgicos expresan IB4 (Isolectina B4) y codifican para la transmisión del estímulo mecánico, mientras que los peptidérgicos expresan otros marcadores moleculares, tales como sustancia P, CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*), TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*), y codifican para estímulos térmicos. Cabe destacar que ya que los receptores opioides μ se localizan principalmente en nociceptores no mielinizados peptidérgicos [14, 19]. Por lo tanto, las diferencias en la analgesia opioide periférica dependientes del tipo de estimulación sensorial explorada, podría explicarse por la distribución diferencial de estos receptores en las poblaciones neuronales que codifican para los distintos estímulos.

En conclusión, este estudio pone de manifiesto que el efecto analgésico de los agonistas opioides es altamente dependiente del tipo de estimulación dolorosa, siendo más prominente para los estímulos térmicos que para los estímulos mecánicos, y que estas diferencias podrían deberse a la participación de los receptores opioides periféricos en la analgesia frente a estímulos térmicos y no frente a estímulos mecánicos.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Ministerio Español de Educación y Ciencia (SAF2010-15343), la Secretaría General de Economía y Competitividad de España (SAF2013-47481), la Junta de Andalucía (Grupo CTS-109), fondos FEDER, Laboratorios Esteve, el Centro Español de Desarrollo Tecnológico e Industrial (proyecto Genius Pharma), Ministerio Español de Ciencia e Innovación (mediante una beca de Formación de Profesorado Universitario a C. Sánchez-Fernández), y por el Plan de Investigación de la Universidad de Granada (E.J. Cobos).

Referencias

1. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 2010; 120(11):3760-72.

2. Joshi SK, Mikusa JP, Weaver B, Honore P. Morphine and ABT-594 (a nicotinic acetylcholine agonist) exert centrally mediated antinociception in the rat cyclophosphamide cystitis model of visceral pain. *J Pain* 2008; 9(2):146-56.
3. Khalefa BI, Shaqura M, Al-Khrasani M, Furst S, Mousa SA, Schafer M. Relative contributions of peripheral versus supraspinal or spinal opioid receptors to the antinociception of systemic opioids. *Eur J Pain* 2012; 16(5):690-705.
4. Kolesnikov YA, Jain S, Wilson R, Pasternak GW. Peripheral morphine analgesia: synergy with central sites and a target of morphine tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279(2):502-6.
5. Kolesnikov YA, Chereshev I, Pasternak GW. Analgesic synergy between topical lidocaine and topical opioids. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295(2):546-51.
6. Menendez L, Lastra A, Hidalgo A, Baamonde A. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *J Neurosci Methods* 2002; 113(1):91-7.
7. Menendez L, Lastra A, Meana A, Hidalgo A, Baamonde A. Analgesic effects of loperamide in bone cancer pain in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81(1):114-21.
8. Morgan MM, Fossum EN, Stalting BM, King MM. Morphine antinociceptive potency on chemical, mechanical, and thermal nociceptive tests in the rat. *J Pain* 2006; 7(5):358-66.
9. Olesen AE, Upton R, Foster DJ, Staahl C, Christrup LL, Arendt-Nielsen L, et al. A pharmacokinetic and pharmacodynamic study of oral oxycodone in a human experimental pain model of hyperalgesia. *Clin Pharmacokinet* 2010; 49(12):817-27.
10. Pasternak GW, Pan YX. Mix and match: heterodimers and opioid tolerance. *Neuron* 2011; 69(1):6-8.
11. Ringkamp M, Raja SN. Dissecting the relative contribution of central versus peripheral opioid analgesia: are the analgesic and adverse effects of opioids inseparable? *Eur J Pain* 2012; 16(5):621-3.
12. Sanchez-Fernandez C, Nieto FR, Gonzalez-Cano R, Artacho-Cordon A, Romero L, Montilla-Garcia A, et al. Potentiation of morphine-induced mechanical antinociception by sigma(1) receptor inhibition: role of peripheral sigma(1) receptors. *Neuropharmacology* 2013; 70:348-58.
13. Sanchez-Fernandez C, Montilla-Garcia A, Gonzalez-Cano R, Nieto FR, Romero L, Artacho-Cordon A, et al. Modulation of peripheral mu-opioid analgesia by sigma1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 348(1):32-45.
14. Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, et al. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 2009; 137(6):1148-59.
15. Smith HS. Peripherally-acting opioids. *Pain Physician* 2008; 11(2 Suppl):S121-S132.
16. Stein C, Schafer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 2003; 9(8):1003-8.
17. Thomas J, Karver S, Cooney GA, Chamberlain BH, Watt CK, Slatkin NE, et al. Methylnaltrexone for opioid-induced constipation in advanced illness. *N Engl J Med* 2008; 358(22):2332-43.

18. Vidal-Torres A, de la Puente B, Rocasalbas M, Tourino C, Bura SA, Fernandez-Pastor B, et al. Sigma-1 receptor antagonism as opioid adjuvant strategy: enhancement of opioid antinociception without increasing adverse effects. *Eur J Pharmacol* 2013; 711(1-3):63-72.
19. Yamamoto J, Kawamata T, Niiyama Y, Omote K, Namiki A. Down-regulation of mu opioid receptor expression within distinct subpopulations of dorsal root ganglion neurons in a murine model of bone cancer pain. *Neuroscience* 2008; 151(3):843-53.
20. Yassen A, Olofsen E, Dahan A, Danhof M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of buprenorphine and fentanyl in rats: role of receptor equilibration kinetics. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313(3):1136-49.



Papel de los receptores sigma-1 en la analgesia opioide periférica

Sánchez-Fernández C, Montilla-García A,
González-Cano R^{1,2}, Nieto FR^{1,2}, Romero L,
Artacho-Cordón A, Montes R, Baeyens JM,
Entrena JM, Cobos EJ

Resumen

Antecedentes: los opioides son analgésicos de acción principalmente central, utilizados para el tratamiento del dolor. Estos fármacos producen diversos efectos adversos de relevancia clínica, como el estreñimiento. La analgesia opioide es potenciada por la inhibición del receptor sigma-1 (σ_1) a nivel central. Sin embargo, se desconoce si esto podría ocurrir en la periferia o si afectaría en igual manera al estreñimiento.

Objetivos: estudiar el papel del receptor σ_1 en la analgesia opioide periférica en un modelo de dolor agudo en el ratón (presión de la pata a 450 g), y en el estreñimiento inducido por opioides.

Resultados: el efecto analgésico de opioides μ (fentanilo, oxicodona, morfina, buprenorfina y tramadol) administrados sistémicamente se incrementó enormemente en ratones knockout- σ_1 . Incluso loperamida, un agonista opioide periférico usado clínicamente como antidiarreico, produjo analgesia en ratones knockout- σ_1 . Esta potenciación de la analgesia opioide se replicó en ratones wild-type tratados localmente (intraplantar) con el antagonista σ_1 BD-1063, y estos efectos fueron revertidos por el agonista σ_1 PRE-084. La administración subcutánea del antagonista opioide periférico naloxona metiodida revirtió más eficazmente la potenciación analgésica opioide inducida por la inhibición de σ_1 que la analgesia opioide en condiciones normales, indicando la relevancia de los receptores opioides periféricos en los efectos de la inhibición σ_1 . La inhibición del receptor σ_1 no potenció el estreñimiento inducido por la administración de loperamida o fentanilo.

Conclusión: la inhibición del receptor σ_1 podría utilizarse como un adyuvante local o sistémico para potenciar la analgesia opioide periférica sin aumentar el estreñimiento.

Introducción

Los fármacos opioides, especialmente los de subtipo μ , son muy utilizados en clínica debido a su acción analgésica [1, 22]. Este efecto se produce principal-

mente a nivel del sistema nervioso central, aunque actualmente no se descarta la participación de receptores opioides periféricos [4, 10, 28]. Sin embargo, el uso de opioides va acompañado de la aparición de efectos adversos como el estreñimiento. Este efecto adverso es producido principalmente a nivel periférico y es una de las principales causas de abandono del tratamiento por parte de los pacientes [23]. Por otro lado, esta acción inhibitoria de los opioides en el tránsito gastrointestinal es utilizada en clínica, y de hecho, el opioide de acción periférica loperamida (y que carece de acción analgésica), es utilizado como antidiarreico [14, 7].

El receptor sigma-1 (σ_1) tras su descubrimiento fue erróneamente clasificado como un receptor opioide, y actualmente es considerado una entidad farmacológica única [3, 34]. Su inhibición no altera el dolor agudo [e.g. 2, 5, 6, 16,24]. Sin embargo, se ha demostrado que cuando se aplica un estímulo térmico, la inhibición farmacológica o genética de este receptor aumenta el efecto analgésico de los opioides a nivel central [12, 21, 17, 18, 15]. No obstante, aún se desconocen numerosos aspectos referentes a la interacción entre el receptor σ_1 y el funcionamiento de los fármacos opioides. Por ejemplo, la ontogénesis y los mecanismos neuroquímicos subyacentes a la analgesia producida por morfina al aplicar un estímulo mecánico y térmico es diferente [13, 26, 30, 32], por lo tanto, no se pueden extrapolar directamente los resultados obtenidos con un estímulo térmico a la aplicación de un estímulo mecánico. Además, los datos publicados hasta el momento describen el papel del receptor σ_1 en la modulación de la analgesia a nivel central, pero se desconoce su papel a nivel periférico. Por último, se desconoce el efecto de la inhibición del receptor σ_1 en el estreñimiento, un prominente efecto opioide adverso de origen periférico.

Por lo tanto, los principales objetivos de nuestro trabajo fueron estudiar la contribución de los receptores opioides periféricos al efecto antinociceptivo de la administración sistémica de analgésicos opioides (como buprenorfina, fentanilo, oxicodona, morfina y tramadol), y del agonista opioide periférico loperamida, en circunstancias normales y durante la inhibición del receptor σ_1 . Además, estudiamos si la inhibición del receptor σ_1 modifica los efectos en el tránsito intestinal los fármacos opioides. Para inhibir los receptores σ_1 , se utilizaron ratones knockout σ_1 (KO- σ_1) o el antagonista selectivo σ_1 BD-1063 [3]. Para estudiar el papel de los receptores opioides periféricos (durante la inhibición del receptor σ_1 y durante una situación control) usamos al antagonista opioide de acción periférica naloxona metiodida [19]. Para estudiar los posibles efectos de la inhibición del receptor σ_1 en el tránsito gastrointestinal inducida por fármacos opioides, utilizamos dos agonistas μ con distinta capacidad de acceso al sistema nervioso central: fentanilo (alta penetrabilidad central) y loperamida (de acción exclusivamente periférica). De manera adicional, y como apoyo de nuestros datos comportamentales, estudiamos la expresión del receptor σ_1 en varias áreas del sistema nervioso central y periférico.

Materiales y Métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los experimentos se realizaron con ratones salvajes (WT) hembra de la cepa CD-1 (Charles River, Barcelona, España) y KO- σ_1 del mismo género y cepa (Esteve, Barcelona, España), con un peso de 25-30 g. Los animales permanecieron estabulados con un ciclo de luz/oscuridad de 12h (08:00-20:00 horas), temperatura controlada de $22\pm 2^\circ\text{C}$ y fueron alimentados con una dieta estándar de laboratorio (Harlan Teklad Research Diet, Madison, WI, EEUU) y agua *ad libitum*. Los experimentos se realizaron en la fase luminosa (09:00-15:00 horas) y distribuidos al azar durante el ciclo estral. Los animales fueron manipulados de acuerdo con la Directiva Europea 86/609/CEE, y los protocolos experimentales fueron aprobados previamente por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

FÁRMACOS Y ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

Se utilizaron los agonistas opioides morfina (Subdirección General de Farmacia y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad), fentanilo, oxicodona, buprenorfina y tramadol, y el agonista opioide periférico loperamida (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España). Los antagonistas opioides usados fueron naloxona y naloxona metiodida (ambos de Sigma-Aldrich Química SA). Los ligandos selectivos σ_1 utilizados fueron el antagonista selectivo BD-1063 y para confirmar su selectividad utilizamos al agonista selectivo σ_1 PRE-084 (ambos de Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK). Los fármacos se disolvieron en salino, con la excepción de la loperamida, que fue disuelta en DMSO al 1% en salino. Las administraciones sistémicas de los fármacos se realizaron mediante inyecciones subcutáneas (s.c.) en la zona interescapular, usando un volumen de 5 ml/kg. Las administraciones locales se realizaron mediante administraciones intraplantares (i.pl.), usando una microjeringa 1710 TLL Hamilton (Teknokroma, Barcelona, España) con una aguja de calibre 30G x 1/2", siendo el volumen de inyección de 20 μl .

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA COMPORTAMENTAL FRENTE A UN ESTÍMULO MECÁNICO DOLOROSO (PRESIÓN DE LA PATA)

Los animales fueron habituados durante 1 h en la habitación de experimentación. Tras ser convenientemente inmovilizados fueron evaluados aplicando un estímulo mecánico romo sobre las patas traseras, tal y como se describió previamente [19] con pequeñas modificaciones. Utilizamos un analgésímetro de presión (Modelo 37215, Ugo-Basile, Varese, Italia), aplicando una estructura cónica con la punta re-

dondeada a una intensidad constante (450 g) sobre la parte dorsal de las patas del animal. Se registró el tiempo de latencia de la respuesta de forcejeo, utilizada como indicador del dolor. Cada ratón fue evaluado dos veces en cada pata de forma alterna dejando un minuto entre medidas.

Los analgésicos opioides fentanilo, morfina, oxicodona y tramadol se administraron vía subcutánea (s.c.) 30 min antes de la evaluación comportamental. La buprenorfina fue administrada 1 h antes ya que su máximo efecto antinociceptivo es más tardío que [33]. Cuando se estudió el efecto de la administración local de BD-1063, este se administró 5 min antes de la evaluación, para minimizar la probabilidad de la absorción sistémica. Para evaluar los efectos del PRE-084, naloxona o naloxona metiodida, estos fármacos o su solvente fueron administrados 5 min antes de la solución de los agonistas μ . En los experimentos donde los fármacos se administraron exclusivamente por vía sistémica, se consideró la media de los tiempos de latencia de las dos medidas realizadas en cada pata. Sin embargo, cuando el BD-1063 se administró por vía i.pl. con objeto de estudiar su efecto a nivel local, la media de las dos evaluaciones obtenidas en cada pata fueron analizadas de forma independiente.

EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRÁNSITO INTESTINAL INDUCIDA POR FENTANILO Y LOPERAMIDA

El efecto de los opioides en el tránsito intestinal se estudió utilizando el procedimiento descrito por Chien y Pasternak (1994), con pequeñas modificaciones. Tras 8 h de ayuno (con acceso libre a agua), fentanilo, loperamida o sus solventes fueron administrados por vía s.c.; 30 min tras la inyección s.c. se administró vía oral 0.3 ml de carbón activado (0.5 g/ml). 30 min tras la administración de este último, es decir, 1 h después de la administración del fármaco, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. El intestino delgado fue aislado y se midió la distancia recorrida por el carbón activado. En los experimentos en los que se asoció al tratamiento opioide un antagonista σ_1 , este último se administró vía s.c. 5 min antes de la solución del opioide.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR σ_1 EN DIVERSAS ÁREAS DEL SISTEMA NERVIOSO MEDIANTE "WESTERN BLOTTING"

Estudiamos la expresión del receptor σ_1 en áreas del sistema nervioso central y periférico implicadas en el dolor y la analgesia opioide, concretamente en la amígdala basolateral (BLA), la bulbo rostroventral (RVM), la sustancia gris periacueductal (PAG), la zona dorsal del ensanchamiento lumbar medular (dSC), y los ganglios

de la raíz dorsal (DRGs) de la médula espinal (a nivel de L4-L5, correspondientes a la inervación de la pata). Las muestras fueron homogeneizadas por sonicación en una solución tamponada, y la concentración de proteínas se midió mediante la técnica de Bradford. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. Se utilizaron muestras tanto de ratones WT como de ratones KO- σ_1 (usados como control de la especificidad del procedimiento).

Las proteínas de las muestras fueron separadas mediante electroforesis en geles de SDS-acrilamida (12 %) y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron durante toda la noche con un anticuerpo monoclonal de ratón frente al receptor σ_1 (1:1000, ref. sc-137075, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) y con el anticuerpo de ratón frente a β -actina (1:2500, ref. sc-81178, Santa Cruz Biotechnology) utilizada como control de carga. Las membranas fueron lavadas (3x) para posteriormente ser incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (1:2500, ref. sc-2005, Santa Cruz Biotechnology). Las bandas se revelaron mediante una técnica de quimioluminiscencia (ECL Prime Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). El análisis de las bandas se realizó con el programa Quantity One (Bio-Rad). Los datos se representaron como la razón de la intensidad de las bandas de σ_1 con respecto a las de β -actina.

ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis estadístico se usó el programa Sigma Plot 12 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EEUU). Los datos experimentales fueron comparados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido del test de Bonferroni. Las diferencias entre los valores se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados y discusión

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE AGONISTAS OPIOIDES μ EN RATONES WT Y KO- σ_1

No se encontraron diferencias significativas en la latencia de respuesta en WT y KO- σ_1 al aplicar 450 g, de acuerdo con la ausencia de diferencias en la respuesta de los ratones de ambos genotipos ante un estímulo mecánico como que hemos descrito recientemente [25].

El efecto antinociceptivo de los opioides fue evaluado como el incremento en el tiempo de latencia de respuesta con respecto a los ratones tratados con sus solventes, al aplicar el estímulo doloroso de 450 g. La administración s.c. de los anal-

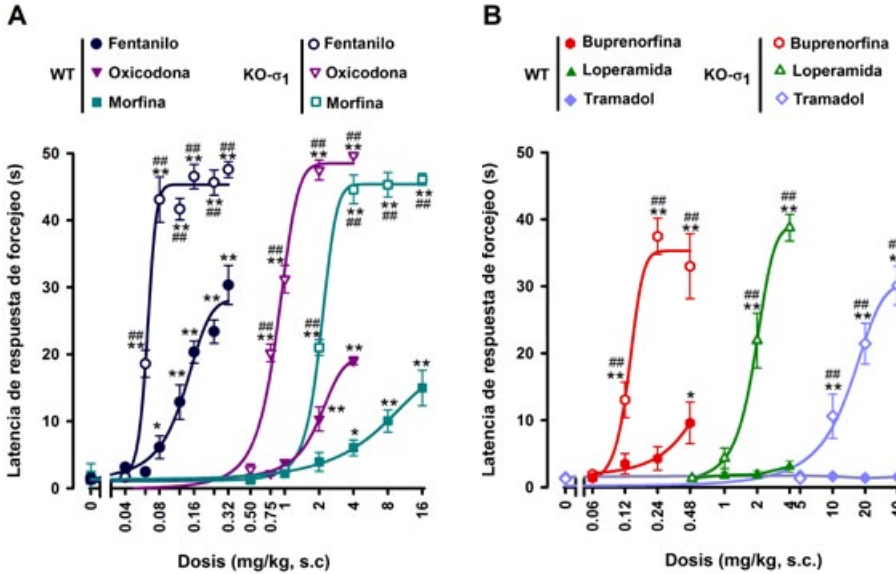


FIGURA 1. Latencia de forcejeo (presión de la pata, 450 g) tras la administración sistémica (s.c.) de: (A) fentanilo, oxidodona y morfina; (B) buprenorfina, loperamida y tramadol, o sus solventes (dosis 0), en ratones wild-type (WT) y knockout σ_1 (σ_1 -KO).

Diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en los grupos tratados con solvente y los tratados con opioides: *P < 0.05; **P < 0.01, y entre los valores obtenidos en ratones WT y σ_1 -KO tratados con la misma dosis de un mismo opioide: ##P < 0.01 (ANOVA de doble vía seguido del test de Bonferroni).

gésicos opioides fentanilo (0,04-0,32 mg/kg), oxidodona (0,75-4 mg/kg) o morfina (0,5-16 mg/kg), indujo un efecto antinociceptivo dosis dependiente en ratones WT. Sin embargo, la administración de buprenorfina (0,06-0,48 mg/kg, s.c.) indujo un efecto antinociceptivo estadísticamente significativo solo a la dosis más alta en estos ratones. Tramadol (5-40 mg/kg, s.c.) no tuvo efecto alguno (Fig. 1 B, símbolos cerrados). Los datos obtenidos con la buprenorfina y el tramadol en el WT muestran que este modelo es muy exigente en cuanto a la detección de efectos analgésicos.

Las dosis de fármaco necesarias para obtener un efecto significativo en ratones KO- σ_1 fue menor que en ratones WT, obteniéndose un desplazamiento hacia la izquierda de todas las curvas dosis-respuesta. Además, el efecto antinociceptivo conseguido con las dosis más elevadas de los fármacos estudiados fue marcadamente superior en los ratones KO- σ_1 (Fig. 1 A y B, símbolos abiertos).

Además, estudiamos el efecto del agonista opioide periférico loperamida en una situación control y de inhibición del receptor σ_1 . De acuerdo con estudios previos, la administración s.c. de loperamida (1-4 mg/kg) no indujo ningún efecto en la nocicepción aguda frente al estímulo mecánico en ratones WT [19, 27]. Sin embargo, los ratones KO- σ_1 mostraron un marcado incremento de la latencia de respuesta al ser tratados con este agonista opioide periférico. Este efecto antinociceptivo fue mayor incluso que el obtenido en ratones WT tratados con opioides mayores como fentanilo, morfina u oxicodona, lo que sugiere un marcado incremento de la acción opioide periférica en estos ratones modificados genéticamente (Fig. 1 B).

Estos resultados sugieren que la inhibición genética del receptor σ_1 potencia la antinocicepción mecánica inducida por la administración sistémica de diversos agonistas μ usados en clínica como analgésicos. Asimismo, los resultados obtenidos con el agonista opioide periférico loperamida, apuntan a que además de modular a nivel central el efecto antinociceptivo de los opioides frente a estímulos térmicos, como se había descrito previamente [12, 21, 17, 18, 16], el receptor σ_1 es capaz de modular el efecto antinociceptivo opioide a nivel periférico frente a estímulos mecánicos.

CONTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES OPIOIDES PERIFÉRICOS A LA ANTINOCICEPCIÓN INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA (SUBCUTÁNEA) DE AGONISTAS OPIOIDES μ EN RATONES WT Y KO- σ_1

Dado el incremento por la inhibición del receptor σ_1 de la antinocicepción inducida por loperamida, los siguientes experimentos fueron dirigidos a evaluar la contribución de los receptores opioides periféricos en la antinocicepción inducida por los diversos agonistas μ evaluados en este estudio, tanto en una situación control como durante la inhibición del receptor σ_1 . Para ello, realizamos experimentos de asociación de los distintos agonistas opioides con el antagonista opioide periférico naloxona metiodida.

La administración de naloxona metiodida (2-8 mg/kg, s.c.) no alteró el tiempo de latencia de respuesta de los animales WT tratados con dosis analgésicas de fentanilo (0.16 mg/kg, s.c.), morfina (16 mg/kg, s.c.) o buprenorfina (0.48 mg/kg, s.c.). Estos datos concuerdan con la visión clásica de la producción de analgesia opioide a nivel central, en la que los receptores opioides periféricos juegan un papel mínimo [8, 9, 29, 11] (Fig. 2). Sin embargo, la antinocicepción inducida por oxicodona (4 mg/kg, s.c.) en ratones WT sí fue revertida por naloxona metiodida, aunque parcialmente, y únicamente a la dosis más alta evaluada de este antagonista opioide periférico (8 mg/kg, s.c.) (Fig. 2). Esta reversión parcial del efecto de la oxicodona es consistente con datos clínicos que sugieren que parte de los efectos analgésicos de la oxicodona pueden producirse a nivel periférico [20].

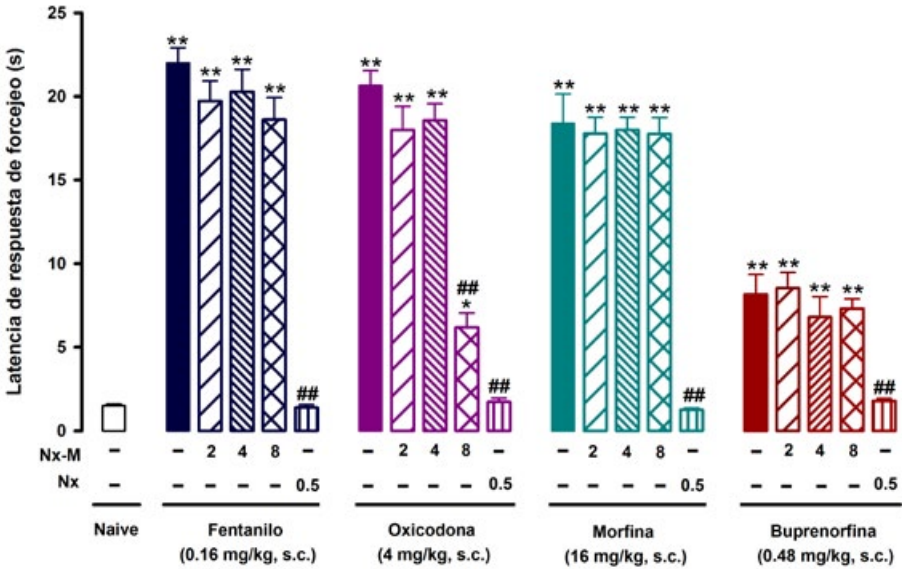


FIGURA 2. Latencia de forcejeo (presión de la pata, 450 g) de ratones wild-type (WT) tras la administración sistémica (s.c.) de fentanilo, oxycodona, morfina o buprenorfina, asociados con naloxona (Nx), naloxona metiodida (Nx-M) o su solvente.

Diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en ratones naive y animales tratados con los agonistas opioides: **P < 0.01; y entre grupos tratados con los agonistas opioides solos o asociados a Nx, Nx-M o su solvente: ##P < 0.01 (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

En cambio, la asociación del antagonista opioide con penetrabilidad central naloxona (0.5 mg/kg, s.c.) revirtió completamente el efecto antinociceptivo inducido por fentanilo, morfina, buprenorfina u oxycodona en ratones WT (Fig. 2).

Estos datos indican que en nuestras condiciones experimentales, el efecto antinociceptivo de los agonistas opioides en ratones WT es debido principalmente a acciones centrales, con la excepción de la oxycodona que mostró cierta sensibilidad al antagonismo de los receptores opioides periféricos.

Para estudiar la participación de los receptores opioides periféricos en el incremento de la antinocicepción opioide en ratones KO- σ_1 , utilizamos dosis sistémicas de agonistas opioides que producen un marcado tiempo de latencia en estos ratones KO, pero un efecto mínimo o nulo en ratones WT. El incremento antinociceptivo observado en ratones KO- σ_1 tratados s.c. con fentanilo (0.08 mg/kg) fue revertido

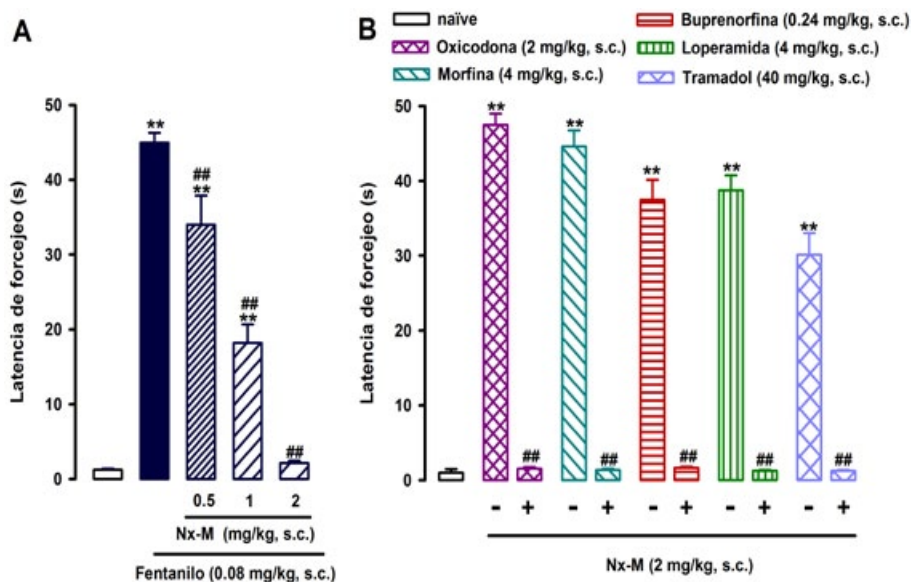


FIGURA 3. Latencia de forcejeo (presión de la pata, 450 g) en ratones knockout σ_1 (σ_1 -KO) tras la administración sistémica (s.c.) de (A) la asociación de fentanilo con naloxona metiodida (Nx-M) o su solvente, y (B) la asociación de oxycodona, morfina, buprenorfina, loperamida o tramadol con Nx-M o su solvente. Diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en ratones control (sin tratamiento farmacológico, barras blancas) y animales tratados con los agonistas opioides: ** $P < 0.01$; y entre los valores de los grupos tratados con los agonistas opioides solos y asociados con Nx-M: ## $P < 0.01$ (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

completamente y de manera dosis dependiente por la administración de naloxona metiodida (0.5-2 mg/kg, s.c.) (Fig. 3A). De igual manera, el incremento en la antinocicepción inducido por oxycodona (2 mg/kg), morfina (4 mg/kg), buprenorfina (0.24 mg/kg), tramadol (40 mg/kg) o loperamida (4 mg/kg) en ratones KO- σ_1 fue revertido completamente por una dosis baja de naloxona metiodida (2 mg/kg) (Fig. 3B).

Esta sensibilidad al antagonismo opioide periférico durante la inhibición del receptor σ_1 indica que el incremento del efecto antinociceptivo de los agonistas opioides sistémicos en el ratón KO- σ_1 requiere de la activación de los receptores opioides periféricos. Nuestros resultados no contradicen los datos que habían sido publicados hasta ahora, en los que se describe el papel modulador del receptor σ_1 de la analgesia opioide a nivel central [12, 21, 17, 18, 16], aunque demuestran la gran importancia del receptor σ_1 en la modulación de la analgesia opioide periférica.

EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN LOCAL (INTRAPLANTAR) DEL RECEPTOR σ_1 EN LA ANTINOCICEPCIÓN MECÁNICA INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE AGONISTAS OPIOIDES μ

Puesto que en incremento analgésico detectado en los ratones KO- σ_1 en respuesta a la administración de fármacos opioides sistémicos parece involucrar la activación de receptores opioides periféricos, el paso siguiente fue evaluar si la inhibición del receptor σ_1 a nivel local era suficiente para conseguir un aumento en la antinocicepción mecánica inducida por agonistas opioides μ administrados por vía sistémica. Para ello, administramos a ratones WT por vía sistémica (s.c.) las mismas dosis de agonistas opioides que producían escaso o nulo efecto antinociceptivo, descritas en el apartado anterior, y asociamos la administración de BD-1063 por vía i.pl. La administración local de BD-1063 (200 μ g) a animales tratados sistémicamente con fentanilo, oxicodona, morfina, buprenorfina, tramadol o loperamida incrementó de manera muy notable el tiempo de latencia en la pata inyectada con el antagonista σ_1 (Fig. 4), pero no en la pata contralateral (datos no mostrados), indicando que la potenciación del efecto antinociceptivo del opioide se estaba produciendo efectivamente a nivel local.

Este incremento del efecto antinociceptivo opioide producido por la inhibición local de σ_1 , fue revertido por la administración del agonista σ_1 PRE-084 (32 mg/kg, s.c.), poniendo de manifiesto la especificidad del bloqueo local del receptor σ_1 . Además, esta potenciación local de la antinocicepción opioide fue revertida por la administración de naloxona metiodida (2 mg/kg, s.c.), lo que confirma la participación de los receptores opioides periféricos en los efectos observados (Fig. 4).

Por lo tanto, de estos experimentos se deduce que el bloqueo local del receptor σ_1 es suficiente como para incrementar marcadamente la función de los receptores opioides periféricos, resultando en una marcada antinocicepción opioide a nivel local tras el tratamiento con dosis bajas sistémicas de agonistas opioides.

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR σ_1 A NIVEL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PERIFÉRICO

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo ponen de manifiesto por primera vez la importancia de la modulación del receptor σ_1 en la antinocicepción opioide periférica. Con objeto de obtener una explicación anatómica para estos resultados, comparamos la expresión del receptor σ_1 en áreas del sistema nervioso implicadas en la analgesia opioide, a nivel supraespinal (BLA, RVM y PAG), espinal (dSC) y en el sistema nervioso periférico (DRG). En todas las muestras de ratones WT se pudo detectar una banda de inmunoreactividad en una posición li-

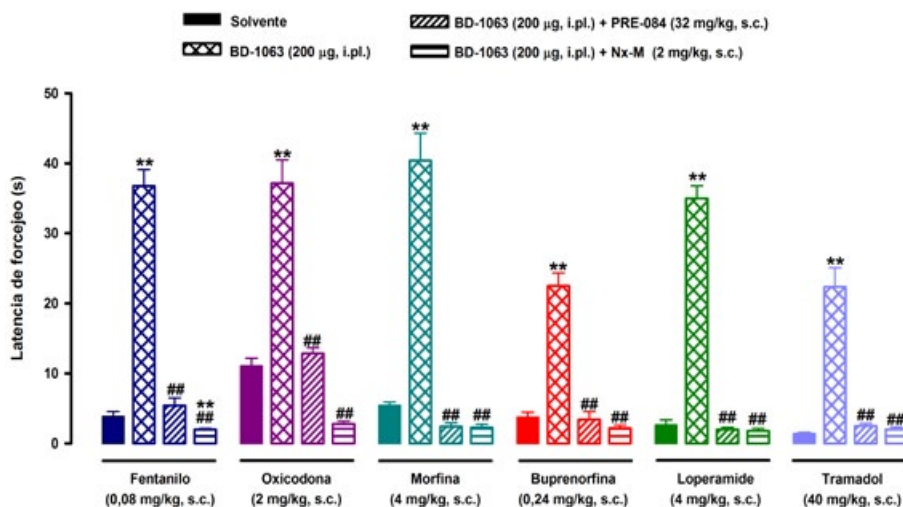


FIGURA 4. Latencia de forcejeo (presión de la pata, 450 g) de animales wild-type tratados intraplantariamente (i.pl.) con BD-1063 (200 µg) en combinación con la administración subcutánea (s.c.) de diversos agonistas opioides μ (fentanilo, oxycodona, morfina, buprenorfina, loperamida o tramadol) y su asociación con PRE-084 (32 mg/kg, s.c.) o naloxona metiodida (Nx-M, 2 mg/kg, s.c.).

Se muestran únicamente los datos obtenidos de la estimulación de la pata administrada con BD-1063. Diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en animales tratados con BD-1063 y su solvente: **P < 0.01; y entre los valores obtenidos en ratones tratados con los agonistas opioides μ asociados a BD-1063, y su asociación con PRE-084 o Nx-M: ##P < 0.01 (ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni).

geramente más elevada a la del marcador de peso molecular de 25 kDa, lo que concuerda con el peso molecular del receptor σ_1 de ratón (28 kDa) [21]. A pesar de que esta banda fue detectable en todas las áreas exploradas, la expresión del receptor σ_1 fue notoriamente más elevada (8-10 veces superior) en el DRG que en cualquier área del sistema nervioso central analizada. No detectamos la banda inmunoreactiva de 28 kDa correspondiente al receptor σ_1 en muestras de las mismas áreas procedentes de ratones KO- σ_1 , lo que indica la especificidad del anticuerpo anti- σ_1 empleado (Fig. 5).

Esta mayor expresión del receptor σ_1 en el DRG en comparación con la obtenida a nivel del sistema nervioso central aboga por una participación importante del receptor σ_1 periférico en la nocicepción.

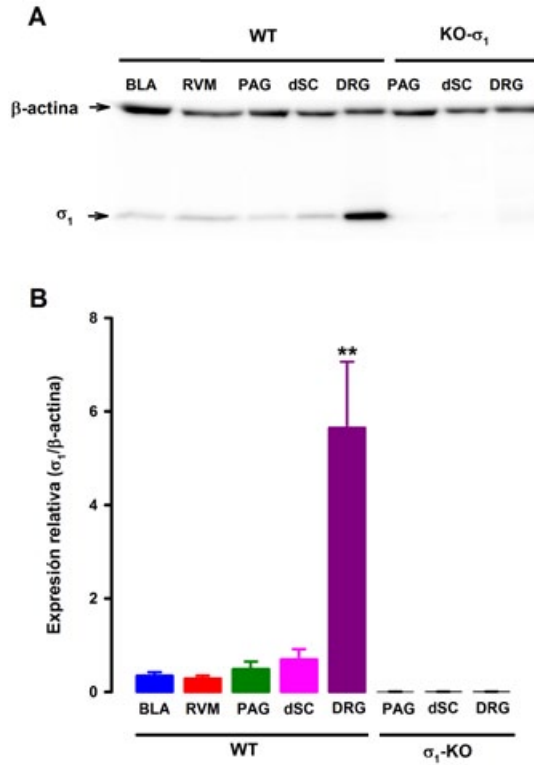


FIGURA 5. Expresión del receptor σ_1 en amígdala basolateral (BLA), médula rostro-ventral (RVM), sustancia gris periacueductal (PAG), la zona dorsal del ensanchamiento de la médula espinal (dSC) y los ganglios (L4-L5) de la raíz dorsal (DRG) en ratones WT y KO- σ_1 .

a) Inmunoblot representativo de los niveles del receptor σ_1 y de β -actina (usando como control de carga). b) Cuantificación de los niveles de inmunomarcaje del receptor σ_1 con respecto a los niveles de β -actina.

MODULACIÓN POR RECEPTOR σ_1 DE LA INHIBICIÓN DEL TRÁNSITO INTESTINAL INDUCIDA POR OPIOIDES

Dado el marcado incremento en la antinocicepción opioide por la inhibición del receptor σ_1 , nos preguntamos si ocurriría igual con otros efectos derivados de la administración de opioides, en concreto con la inhibición del tránsito intestinal, ya que tiene un origen principalmente periférico [1].

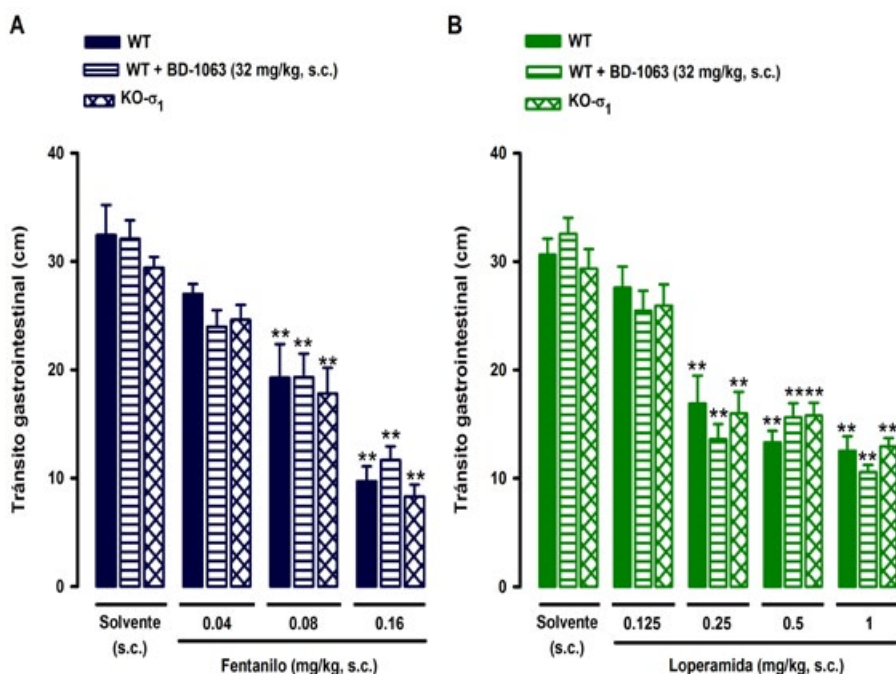


FIGURA 6. Efectos de la administración subcutánea (s.c.) de fentanilo (A) y loperamida (B) en el tránsito intestinal de ratones wild-type (WT) tratados con BD-1063 (32 mg/kg, s.c.) y ratones knockout σ_1 (KO- σ_1).

Se muestran únicamente los datos obtenidos de la estimulación de la pata administrada con BD-1063. Diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en animales tratados con BD-1063 y su solvente: ** $P < 0.01$; y entre los valores obtenidos en ratones tratados con los agonistas opioides μ asociados a BD-1063, y su asociación con PRE-084 o Nx-M: ** $P < 0.01$ (ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni).

La administración s.c. de fentanilo (0.04–0.16 mg/kg) o loperamida (0.125–1 mg/kg) indujo una inhibición dosis dependiente del tránsito intestinal y su efecto fue similar en ratones WT y KO- σ_1 (Fig. 6A y B para fentanilo y loperamida, respectivamente). Además, el bloqueo farmacológico del receptor σ_1 con BD-1063 (32 mg/kg, s.c.) tampoco modificó la inhibición del tránsito inducida por fentanilo o loperamida (Fig. 6A y B, respectivamente). Esta ausencia de modulación por la inhibición del receptor σ_1 de las alteraciones en el tránsito intestinal inducidas por los opioides ha sido replicada recientemente por un estudio realizado en paralelo [31].

Por lo tanto, pese a que la inhibición del receptor σ_1 incrementa marcadamente la antinocicepción opioide, no incrementa la inhibición del tránsito intestinal. Estos efectos diferenciales de la inhibición del receptor σ_1 en la función opioide sugieren que estos receptores podrían expresarse en tipos concretos de neuronas implicadas en la transmisión del dolor pero no en otros procesos (motilidad gastrointestinal), o bien que los mecanismos de potenciación del efecto opioide por la inhibición del receptor σ_1 en distintos tipos neuronales son diferentes. Independientemente de las razones de esta modulación diferencial de los efectos beneficiosos y adversos de los opioides por la inhibición del receptor σ_1 , nuestros resultados sugieren que el bloqueo del receptor σ_1 podría incrementar el rango terapéutico de los opioides, potenciando la analgesia sin alterar otros efectos perniciosos derivados de su uso.

Conclusión

La inhibición del receptor σ_1 , genética o incluso farmacológica a nivel local, incrementa la antinocicepción opioide a nivel periférico frente a un estímulo mecánico, de lo que se deduce que el receptor σ_1 es un freno biológico a la analgesia opioide periférica. Esta potenciación de la analgesia opioide no conlleva un incremento de efectos no analgésicos, como la inhibición del tránsito intestinal inducida por la administración de opioides. Por lo tanto, el antagonismo σ_1 podría tener relevancia clínica como adyuvante, a nivel sistémico o local, para incrementar la analgesia opioide sin incrementar los efectos adversos de los opioides.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Ministerio Español de Educación y Ciencia (SAF2006-06122) Ministerio Español de Ciencia e Innovación (SAF2010-15343 y becas de Formación de Profesorado Universitario a C. Sánchez-Fernández y R. González-Cano), Junta de Andalucía (Grupo CTS-109), fondos FEDER, Laboratorios Esteve, por el Centro Español de Desarrollo Tecnológico e Industrial (proyecto Genius Pharma), y por el Plan de Investigación de la Universidad de Granada (E.J. Cobos).

Bibliografía

1. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* 2011; 115:1363-1381.
2. Chien CC and Pasternak GW. Selective antagonism of opioid analgesia by a sigma system. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271:1583-1590.
3. Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendán CM, Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma₁ receptor ligands. *Curr Neuropharmacol* 2008; 6:344-366.

4. Craft RM, Henley SR, Haaseth RC, Hruby VJ, Porreca F. Opioid antinociception in a rat model of visceral pain: systemic versus local drug administration. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275:1535-42.
5. De la Puente B, Nadal X, Portillo-Salido E, Sanchez-Arroyos R, Ovalle S, Palacios G, Muro A, Romero L, Entrena JM, Baeyens JM, Lopez-García JA, Maldonado R, Zammanillo D, Vela JM. Sigma-1 receptors regulate activity-induced spinal sensitization and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain* 2009; 145: 294-303.
6. 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* 2009; 205:21-33.
7. Gallelli L, Colosimo M, Tolotta GA, Falcone D, Luberto L, Curto LS, Rende P, Mazzei F, Marigliano NM, De Sarro G, Cucchiara S. Prospective randomized double-blind trial of racecadotril compared with loperamide in elderly people with gastroenteritis living in nursing homes. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; 66:37-144.
8. Greenwood-Van Meerveld B, Standifer KM. Methylnaltrexone in the treatment of opioid-induced constipation. *Clin Exp Gastroenterol* 2008; 1:49-58.
9. Joshi SK, Mikusa JP, Weaver B, Honore P. Morphine and ABT-594 (a nicotinic acetylcholine agonist) exert centrally mediated antinociception in the rat cyclophosphamide cystitis model of visceral pain. *J Pain* 2008; 9:146-56.
10. Kayser V, Lee SH, Guilbaud G. Evidence for a peripheral component in the enhanced antinociceptive effect of a low dose of systemic morphine in rats with peripheral mononeuropathy. *Neuroscience* 1995; 64:537-45.
11. Khalefa BI, Shaqura M, Al-Khrasani M, Fürst S, Mousa SA, Schäfer M. Relative contributions of peripheral versus supraspinal or spinal opioid receptors to the antinociception of systemic opioids. *Eur J Pain* 2012; 16:690-705.
12. King M, Pan YX, Mei J, Chang A, Xu J, Pasternak GW. Enhanced kappa-opioid receptor-mediated analgesia by antisense targeting the sigma1 receptor. *Eur J Pharmacol* 1997; 331:R5-R6.
13. Kuraishi Y, Hirota N, Satoh M, Takagi H. Antinociceptive effects of intrathecal opioids, noradrenaline and serotonin in rats: mechanical and thermal algesic tests. *Brain Res* 1985; 326:168-71.
14. Layer P, Andresen V. Review article: rifaximin, a minimally absorbed oral antibacterial, for the treatment of travellers' diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31:1155-1164.
15. 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; 78:449-53.
16. Marrazzo A, Cobos EJ, Parenti C, Arico G, Marrazzo G, Ronsisvalle S, Pasquinucci L, Prezzavento O, Colabufo NA, Contino M, Gonzalez LG, Scoto GM, Ronsisvalle G. Novel potent and selective sigma ligands: evaluation of their agonist and antagonist properties. *J Med Chem* 2011; 54:3669-3673.

17. Mei J, Pasternak GW. Sigma-1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J. Pharmacol Exp Ther* 2002; 300:1070-1074.
18. Mei J, Pasternak. Modulation of brainstem opiate analgesia in the rat by sigma-1 receptors: a microinjection study. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322:1278-1285.
19. Menéndez L, Lastra A, Meana A, Hidalgo A, Baamonde A. Analgesic effects of loperamide in bone cancer pain in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81:114-121.
20. Olesen AE, Upton R, Foster DJ, Staahl C, Christrup LL, Arendt-Nielsen L, Drewes AM. A pharmacokinetic and pharmacodynamic study of oral oxycodone in a human experimental pain model of hyperalgesia. *Clin Pharmacokinet* 2010; 49:817-827.
21. Pan YX, Mei J, Xu J, Wan BL, Zuckerman A, Pasternak GW. Cloning and characterization of a mouse sigma1 receptor. *J Neurochem* 1998; 70:2279-2285.
22. Pasternak GW, Pan YX. Mu opioid receptors in pain management. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 2011; 49:21-25.
23. Ringkamp M, Raja SN. Dissecting the relative contribution of central versus peripheral opioid analgesia: are the analgesic and adverse effects of opioids inseparable?. *Eur J Pain* 2012; 16:621-3.
24. Romero L, Zamanillo D, Nadal X, Sanchez-Arroyos R, Rivera-Arconada I, Dordal A, Montero A, Muro A, Bura A, Segales C, Laloya M, Hernandez E, Portillo-Salido E, Escriche M, Codony X, Encina G, Burgueño J, Merlos M, Baeyens JM, Giraldo J, Lopez-Garcia JA, Maldonado R, Plata-Salaman CR, Vela JM. Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *Br J Pharmacol* 2012; 166:2289-2306.
25. Sánchez-Fernández C, Nieto FR, González-Cano R, Artacho-Cordón A, Romero L, Montilla-García A, Zamanillo D, Baeyens JM, Entrena JM, Cobos EJ. Potentiation of morphine-induced mechanical antinociception by σ_1 receptor inhibition: Role of peripheral σ_1 receptors. *Neuropharmacology* 2013; 70:348-58.
26. Sato T, Sakurada S, Takahashi N, Sakurada T, Tan-No K, Wako K, Kisara K. Contribution of spinal μ_1 -opioid receptors to morphine-induced antinociception. *Eur J Pharmacol* 1999; 369:183-187.
27. Sevostianova N, Danysz W, Besspalov AY. Analgesic effects of morphine and loperamide in the rat formalin test: interactions with NMDA receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2005; 525:83-90.
28. Shannon HE, Lutz EA. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. *Neuropharmacology* 2002; 42:253-61.
29. Thomas J, Karver S, Cooney GA, Chamberlain BH, Watt CK, Slatkin NE, Stambler N, Kremer AB, Israel RJ (2008) Methylnaltrexone for opioid-induced constipation in advanced illness. *N Engl J Med* 2008; 358:2332-43.
30. Tseng LF, Collins KA, Wang Q. Differential ontogenesis of thermal and mechanical antinociception induced by morphine and β -endorphin. *Eur J Pharmacol* 1995; 277: 71-76.
31. Vidal-Torres A, de la Puente B, Rocasalbas M, Touriño C, Andreea Bura S, Fernández-Pastor B, Romero L, Codony X, Zamanillo D, Buschmann H, Merlos M, Baeyens

- JM, Maldonado R, Vela JM. Sigma-1 receptor antagonism as opioid adjuvant strategy: Enhancement of opioid antinociception without increasing adverse effects. *Eur J Pharmacol* 2013; 711: 63-72.
32. Wegert S, Ossipov MH, Nichols ML, Bian D, Vanderah TW, Malan TP Jr, Porreca F. Differential activities of intrathecal MK-801 or morphine to alter responses to thermal and mechanical stimuli in normal or nerve-injured rats. *Pain* 1997; 71:57-64.
33. Yassen A, Olofsen E, Dahan A, Danhof M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of buprenorphine and fentanyl in rats: role of receptor equilibration kinetics. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313:1136-1149.
34. Zamanillo D, Romero L, Merlos M, Vela JM. Sigma 1 receptor: A new therapeutic target for pain. *Eur J Pharmacol* 2013; 16:78-93.



Modulación de la hiperalgesia inflamatoria por los receptores sigma-1 periféricos

Tejada MA, Montilla-García A,
Sánchez-Fernández C, Entrena JM,
Perazzoli G, Baeyens JM, Cobos EJ

Resumen

Antecedentes: La inhibición del receptor sigma-1 (σ_1) alivia el dolor neuropático disminuyendo la sensibilización central. Sin embargo, se desconoce si este receptor participa en el dolor inflamatorio, así como su posible papel en la periferia.

Objetivo: Determinar el papel de los receptores σ_1 en la hiperalgesia inflamatoria inducida por carragenina en el ratón, particularmente en el foco inflamatorio.

Resultados: La administración subcutánea (s.c.) de los antagonistas σ_1 selectivos BD-1063 y S1RA revirtió completamente la hiperalgesia mecánica y térmica inflamatoria. La antihiperalgesia inducida por los antagonistas σ_1 , administrados s.c., fue abolida por la administración intraplantar (i.pl.) del agonista σ_1 PRE-084 en el tejido inflamado, sugiriendo que el bloqueo de los receptores σ_1 periféricos participa en los efectos antihiperálgicos inducidos por los antagonistas σ_1 . De hecho, la administración i.pl de los antagonistas σ_1 en la pata inflamada revirtió completamente la hiperalgesia mecánica inflamatoria. Estos efectos fueron mediados localmente, ya que cuando los tratamientos i.pl. se realizaron en la pata contralateral a la inflamación no alteraron la hiperalgesia. A diferencia de estos efectos antihiperálgicos, la inhibición del receptor σ_1 no tuvo efectos antiedematosos.

Conclusiones: el receptor σ_1 juega un papel importante en la hiperalgesia inflamatoria, y la inhibición de este receptor en el tejido inflamado puede ser útil para el tratamiento del dolor inflamatorio.

Introducción

El receptor sigma (σ_1) es una proteína neuromoduladora [13, 4, 29] presente en importantes áreas de control del dolor en el sistema nervioso central y periférico [1, 15, 2, 25]. Aunque la inhibición del receptor σ_1 no influye en el dolor agudo inducido por un estímulo mecánico o térmico [3, 6, 10, 24], es capaz de incrementar el efecto antinociceptivo de los opioides a nivel central [18, 19] y aliviar la alodinia

neuropática por la inhibición del proceso de sensibilización central [6, 21, 23]. Esto indica la importancia de este receptor en la modulación del dolor a nivel central. Recientemente, hemos mostrado que el bloqueo periférico del receptor σ_1 potencia la analgesia opioide en el dolor agudo [25], pero el papel de este receptor a nivel periférico en un modelo de dolor clínicamente relevante está aún inexplorado.

El dolor inflamatorio es uno de los tipos más importantes de dolor patológico [27, 28]. Por lo tanto, hay una gran necesidad de generar nuevos fármacos para el tratamiento del dolor inflamatorio que mejoren la calidad de vida del paciente. El dolor inflamatorio puede ser inducido experimentalmente por la administración intraplantar de sustancias tales como la carragenina [26, 5], y se caracteriza por hipersensibilidad tanto frente a estímulos mecánicos como térmicos [17, 8]. Debido a que los mecanismos del dolor inflamatorio y neuropático son diferentes, el hecho de que previamente se haya descrito un alivio del dolor neuropático por el bloqueo del receptor σ_1 no implica necesariamente que ocurra lo mismo en el dolor inflamatorio.

A la luz de estos antecedentes, el objetivo de nuestro estudio fue investigar el papel del receptor σ_1 en la hiperalgesia inflamatoria, particularmente en el tejido inflamado. Estudiamos el efecto del bloqueo del receptor σ_1 por administración sistémica (s.c) y local (i.pl) de los antagonistas selectivos BD-1063 y S1RA [12, 4, 7, 23], en la hiperalgesia mecánica y térmica inducida por carragenina. Además, también estudiamos el posible efecto antiinflamatorio del bloqueo del receptor σ_1 , mediante la medida del edema inducido por la carragenina.

Materiales y Métodos

ANIMALES

Para todos los experimentos se utilizaron ratones hembras CD1 (Charles River, Barcelona, España), con un peso entre 25-30 g. Todos los animales permanecieron estabulados en condiciones de temperatura controlada (22 ± 2 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12h (08:00-20:00 horas). Fueron alimentados con una dieta estándar de laboratorio (Harlan Teklad Research Diet, Madison, WI, EEUU) y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron en la fase luminosa (09:00-15:00 horas). Los animales fueron manipulados de acuerdo con la Directiva Europea 86/609/CEE, y los protocolos experimentales fueron aprobados previamente por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

FÁRMACOS Y ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

Los antagonistas del receptor σ_1 usados fueron BD-1063 (Tocris Cookson Ltd., Bristol, United Kingdom) y S1RA (sintetizado y suministrado por Laboratorios Es-

teve, Barcelona, España. PRE-084 (Tocris Cookson Ltd) fue usado como agonista selectivo del receptor σ_1 [12, 4]. El corticosteroide prednisolona (Sigma Aldrich, Madrid, España), se usó como control de fármaco con efectos antiinflamatorios conocidos [22]. Todos los fármacos se disolvieron en suero salino fisiológico estéril (NaCl 0,9%). Para el estudio de los efectos sistémicos de los fármacos, estos se administraron por vía subcutánea (s.c.) en un volumen de 5 ml/kg. Para el estudio de sus efectos locales, estos se administraron intraplantarmente (i.pl.) en un volumen de 20 μ l.

Todos los experimentos farmacológicos fueron realizados a las 3h tras la administración de carragenina o su solvente, ya que a este tiempo la hiperalgesia mecánica y térmica, así como el edema, alcanzaron sus valores máximos (ver Fig. 1 y sección de Resultados). Para estudiar los efectos de los fármacos en la hiperalgesia inflamatoria, los antagonistas σ_1 se administraron 30 min antes de la evaluación, y en los experimentos en los que se asoció la administración de PRE-084 con los antagonistas σ_1 , este se administró 5 minutos antes. Para determinar los efectos de los ligandos σ_1 en el edema inflamatorio, estos se administraron 5 min antes de la administración de carragenina.

INDUCCIÓN DE LA INFLAMACIÓN

El dolor inflamatorio fue inducido mediante la administración i.pl. de 50 μ l de λ -carragenina (1 % en salino) (Sigma Aldrich, Madrid, España). La solución de carragenina fue preparada diariamente e inyectada subcutáneamente en la planta de la pata trasera derecha con una microjeringa Hamilton (1710 TLL) y una aguja de calibre 30^{1/2}. Como control de la carragenina se administró de manera i.pl. el mismo volumen de salino.

EVALUACIÓN DE LA HIPERALGESIA MECÁNICA Y TÉRMICA

La hiperalgesia mecánica se evaluó siguiendo el protocolo previamente descrito [20, 24], con modificaciones. Brevemente, se aplicó un estímulo mecánico romo a una intensidad de 100 g hasta que el ratón mostró la respuesta de forcejeo, utilizando un Analgesímetro de presión (Ugo Basile, Varese, Italia).

La hiperalgesia térmica se evaluó mediante el test de Hargreaves siguiendo el protocolo previamente descrito [21], con modificaciones. Brevemente, los ratones se habituaron sobre una placa atemperada a 30 °C, y posteriormente se registró el tiempo de retirada de la pata al ser estimulada con un haz de luz a 85 mW/cm² (IITC, CA, EE.UU.).

EVALUACIÓN DEL EDEMA INDUCIDO POR CARRAGENINA

El edema se valoró mediante un pletismómetro (Ugo Basile), registrando la diferencia entre el volumen de la pata antes y 3h después de la administración de carragenina o su solvente.

ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis estadístico se usó el programa Sigma Plot 12 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EEUU). Los datos experimentales fueron comparados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido del test de Bonferroni. En todos los casos, las diferencias entre los valores fueron consideradas significativas cuando p fue menor a 0,05. La dosis eficaz 50 (DE_{50}) obtenida de las curvas dosis respuesta se calculó mediante una regresión no lineal a una sigmoide.

Resultados

CURSOS TEMPORALES DEL EDEMA, HIPERALGESIA MECÁNICA E HIPERALGESIA TÉRMICA INDUCIDA POR CARRAGENINA

Evaluamos el desarrollo del edema y la hiperalgesia mecánica y térmica en ratones tratados con carragenina. La administración i.pl. de este agente produjo un incremento del volumen de la pata desde el primer tiempo evaluado (1h), hasta las la última medida (7h), produciendo el máximo edema a las 3h (Fig 1a). Los animales inyectados con el vehículo no manifestaron cambios significativos en ninguno de los tiempos evaluados (Fig. 1a).

Los ratones manifestaron una progresiva reducción en el tiempo de respuesta frente al estímulo térmico o mecánico, manifestando la máxima hiperalgesia a las 3h en ambas estimulaciones sensoriales (Fig. 1b,c). La hiperalgesia mecánica se mantuvo estable hasta la última evaluación, mientras que la hiperalgesia térmica fue desapareciendo llegando a tener valores similares a los valores pretratamiento 6h tras la administración de carragenina. La administración del solvente de la carragenina no produjo ningún cambio significativo en la respuesta de los animales frente al estímulo mecánico o térmico (Fig. 1b,c).

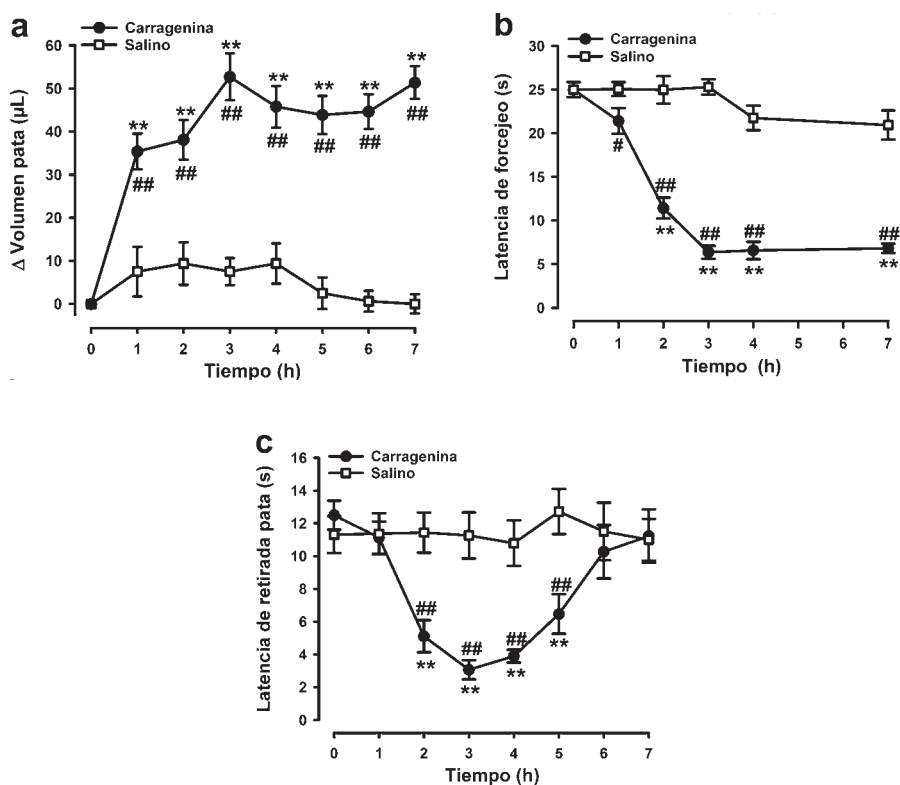


FIGURA 1. Curso temporal del edema y de la hiperalgesia mecánica y térmica inducida por carragenina en el ratón.

El volumen de la pata (a), la latencia de forcejeo producida por presión de la pata (b) y la latencia de retirada de la pata en respuesta a un estímulo térmico (c), fueron recogidas en ratones naïve (tiempo 0) y a varios tiempos después de la administración intraplantar de carragenina o su solvente (salino). Cada animal fue evaluado en un solo test. Cada punto y línea vertical representa la media $\pm$ SEM de los valores obtenidos de 8-10 ratones. En la medición del edema (a) y de la hiperalgesia térmica se realizaron medidas repetidas en los mismos animales, mientras que en la medición de la hiperalgesia mecánica (b) se utilizó un grupo experimental diferente para cada tiempo evaluado. Diferencias significativas entre los valores de los animales tratados con carragenina o su solvente: ** $p < 0.01$, y entre los valores obtenidos en el tiempo 0 y sus posteriores evaluaciones después de la administración de carragenina o su solvente: # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ (ANOVA de dos vías para medidas repetidas en a y c, y ANOVA de dos vías en b; seguidos en ambos casos por el post-test de Bonferroni).

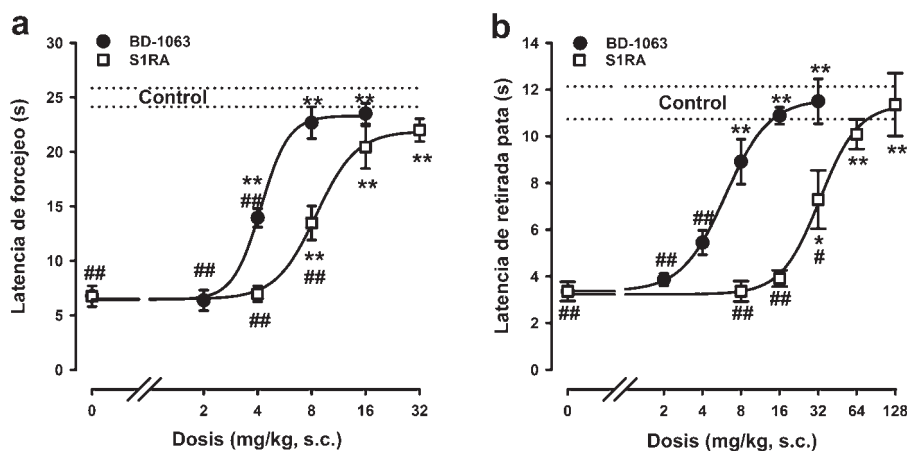


FIGURA 2. Curva dosis respuesta del efecto de la administración sistémica de los antagonistas σ_1 BD-1063 y S1RA en la hiperalgesia inflamatoria mecánica térmica.

Los resultados muestran la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico (a), y la latencia de retirada de la pata ante un estímulo térmico (b), en ratones con inflamación inducida por carragenina. Los ratones fueron tratados con los antagonistas σ_1 o su solvente (dosis 0) de manera subcutánea (s.c.). Cada punto y línea vertical representa la media $\pm$ SEM de los valores obtenidos de 8-10 ratones. La línea discontinua (control) representa la media $\pm$ SEM de los valores de animales tratados con el solvente de la carragenina (salino). Diferencias significativas entre los valores de los animales tratados con el fármaco o su vehículo, tanto en animales tratados con carragenina: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, o salino (control): # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE LOS ANTAGONISTAS σ_1 SOBRE LA HIPERALGESIA INFLAMATORIA

El efecto de los antagonistas selectivos σ_1 (BD-1063 y S1RA) en la hiperalgesia inflamatoria fue determinado a las 3h tras la administración de carragenina. La administración s.c de BD-1063 o S1RA, revirtió la hiperalgesia mecánica y térmica de manera dosis dependiente (Fig. 2a y b, respectivamente). Las DE50 de la reversión de la hiperalgesia mecánica y térmica por BD-1063 fueron de $4,2 \pm 0,1$ y $6,1 \pm 0,1$ mg/kg, respectivamente. Los valores de DE50 de la reversión de la hiperalgesia mecánica y térmica por S1RA fueron de $8,5 \pm 0,4$ and $33,1 \pm 2,1$ mg/kg, respectivamente.

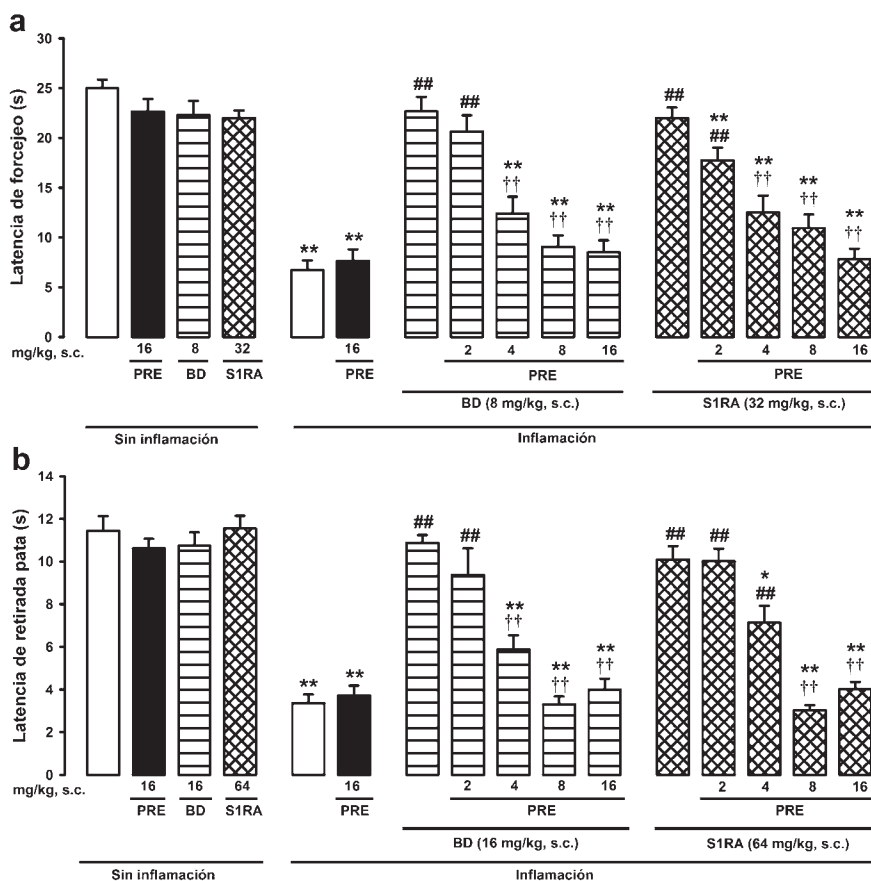


FIGURA 3. Efecto de la administración sistémica de los antagonistas σ_1 BD-1063 (BD) y S1RA, solos o asociados a PRE-084 (PRE), en la hiperalgesia inflamatoria. Los resultados muestran la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico (a), y la latencia de retirada de la pata ante un estímulo térmico (b), en ratones tratados con carragenina (inflamación) o su solvente (sin inflamación), y administrados subcutáneamente (s.c.) con los fármacos o su solvente. Cada barra y línea vertical representa la media $\pm$ SEM de los valores obtenidos de 8-10 ratones. Diferencias significativas entre los valores de los animales sin inflamación tratados con el solvente de los fármacos, y ratones con inflamación tratados con el fármaco o su solvente: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; entre animales con inflamación tratados con el antagonista σ_1 y su solvente: ## $p < 0.01$; y entre los animales tratados con el antagonista σ_1 solo o asociado a PRE: †† $p < 0.01$. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de ratones sin inflamación tratados con los ligandos σ_1 o su solvente (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

Ambos antagonistas σ_1 mostraron una eficacia antihiperalgésica máxima, ya que fueron capaces de revertir completamente tanto la hiperalgnesia mecánica como térmica (Fig. 2a y b, respectivamente).

Las dosis de los antagonistas σ_1 usadas para revertir completamente la hiperalgnesia mecánica y térmica no tuvieron ningún efecto sobre ratones sin inflamación (Fig. 3a,b, panel izquierdo), por lo que a pesar del marcado efecto antihiperalgésico de ambos antagonistas, estos compuestos no parecen modificar el dolor agudo.

El agonista selectivo σ_1 PRE-084, no alteró la respuesta comportamental ni en animales sin inflamación ni en animales con inflamación (Fig. 3a,b). Si embargo, este agonista revirtió de manera dosis dependiente el efecto antihiperalgésico de los antagonistas σ_1 en la hiperalgnesia inflamatoria frente a ambos tipos de estímulos (Fig. 3a,c).

EFFECTO EN LA HIPERALGESIA INFLAMATORIA DE LA ADMINISTRACIÓN LOCAL (INTRAPLANTAR) DE LOS FÁRMACOS SELECTIVOS σ_1

La administración local del agonista PRE-084 (75 mg) en la pata con o sin inflamación, no alteró la respuesta de los animales frente al estímulo mecánico (Fig. 4a). Sin embargo, cuando el PRE-084 fue administrado en la pata inflamada, eliminó el efecto antihiperalgésico del BD-1063 y S1RA administrados sistémicamente (Fig. 4a). Para comprobar que el efecto intraplantar del PRE-084 se producía en el lugar de la administración (la pata inflamada), realizamos un experimento administrando este producto en la pata contralateral a la inflamación. En estas condiciones, el PRE-084 no revirtió el efecto antihiperalgésico de los antagonistas σ_1 frente a la estimulación mecánica (Fig. 4b). De manera similar, la administración del PRE-084 en la pata inflamada (pero no en la pata contralateral a la inflamación) revirtió el efecto antihiperalgésico del BD-1063 y S1RA frente al estímulo térmico (Fig. 4c,d), sin alterar la respuesta comportamental de los animales administrados con el solvente de los antagonistas σ_1 (Fig. 4c). Estos datos indican que los receptores σ_1 en el foco inflamatorio participan en los efectos antihiperalgésicos del BD-1063 y del S1RA administrados sistémicamente.

Para estudiar si el bloqueo farmacológico de los receptores σ_1 en el foco inflamatorio era suficiente como para producir un efecto antihiperalgésico, administramos BD-1063 y S1RA i.pl. en la pata inflamada. Ambos antagonistas administrados en la pata inflamada produjeron un efecto antihiperalgésico frente al estímulo mecánico de manera dosis dependiente (Fig. 5a). Este efecto antihiperalgésico inducido por la administración local de los antagonistas σ_1 fue revertido por la administración sistémica de PRE-084, indicando la selectividad del efecto antihiperalgésico del BD-1063 y del S1RA (Fig. 5a). Sin embargo, al administrar vía i.pl. los antagonistas σ_1 en animales sin inflamación no modificaron

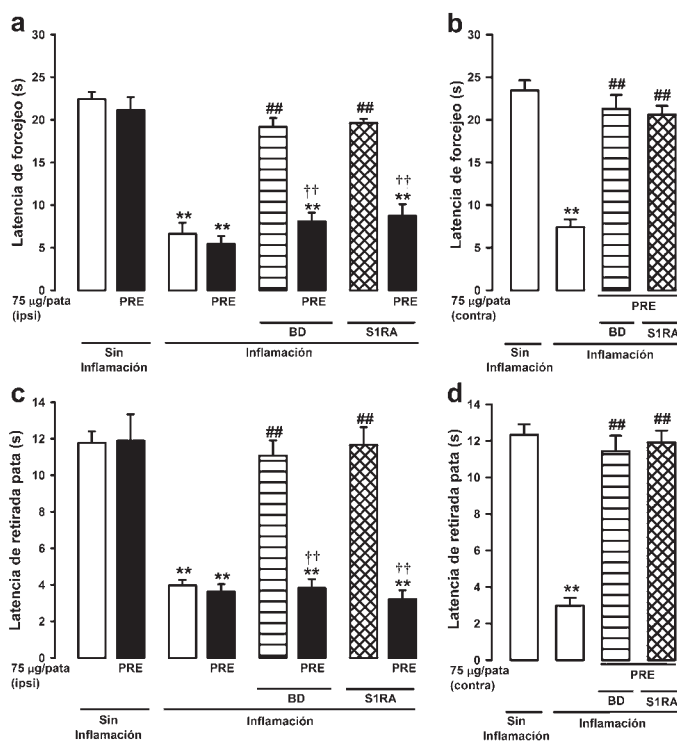


FIGURA 4. Efecto de la administración sistémica de los antagonistas σ_1 , BD-1063 y S1RA solo o asociado a la administración i.p.l del PRE-084 (PRE) sobre la respuestas comportamentales a estímulos mecánicos y térmicos en ratones con y sin inflamación.

Los resultados representan la latencia de forcejeo inducido por la presión de la pata en ratones inyectados i.p.l. con carragenina (inflamados) o salino (sin inflamación), y tratados subcutáneamente (s.c) con los antagonistas σ_1 (BD o S1RA) o su solvente (a, b), y la latencia de retirada de la pata a estímulos térmicos en ratones con y sin inflamación tratados s.c con los antagonistas σ_1 o su solvente (c, d). Los ratones fueron tratados i.p.l con PRE o su solvente en la misma pata inyectada con carragenina (ipsi) o salino (a, c), o en la pata contralateral (contra) a la carragenina (b, d). Todos los ratones fueron estimulados en la pata donde se administró la carragenina o su solvente. Cada barra y línea vertical representa la media $\pm$ SEM de los valores obtenidos de 8-10 ratones. Diferencias significativas entre los valores de los animales sin inflamación tratados con el solvente de los fármacos, y ratones con inflamación tratados con el fármaco o su solvente: ** $p < 0.01$; entre animales tratados con el antagonista σ_1 y su solvente: ## $p < 0.01$; y entre los animales tratados con el antagonista σ_1 solo o asociado a PRE: †† $p < 0.01$. (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

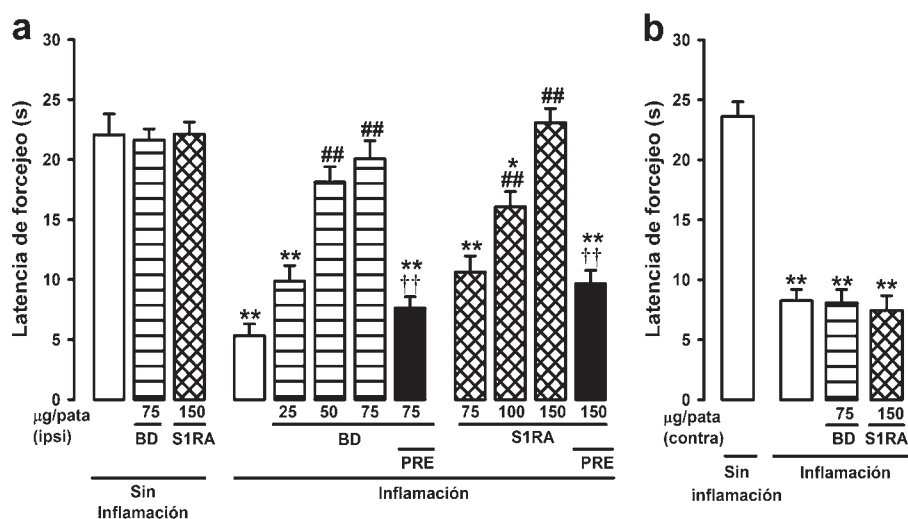


FIGURA 5. Efecto de la administración local de los antagonistas σ_1 BD-1063 (BD) y S1RA en la hiperalgesia mecánica inflamatoria, solos o asociados a la administración sistémica de PRE-084 (PRE).

Los resultados muestran la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico en ratones tratados con carragenina (inflamación) o su solvente (sin inflamación), y administrados intraplantarmente (i.pl.) con un antagonista σ_1 solo o asociado a la administración subcutánea (s.c.) de PRE. Los ratones fueron tratados i.pl. con BD, S1RA o su solvente en la misma pata (ipsi) donde se inyectó la carragenina o su solvente (a), o en la pata contralateral (b). Cada barra y línea vertical muestra la media $\pm$ SEM de los valores obtenidos de 8-10 ratones. Diferencias significativas entre los valores de ratones sin inflamación tratados con el solvente de los fármacos y los valores de ratones con inflamación tratados con el fármaco o su solvente: ** $p < 0.01$; entre los ratones tratados con los antagonistas σ_1 y su solvente: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; y entre los animales tratados con los antagonistas σ_1 solos o asociado a PRE: †† $p < 0.01$ (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

las respuestas comportamentales de los ratones (Fig. 5a), lo que indica que no alteran el dolor normal. El efecto antihiperálgico de los antagonistas σ_1 se produjo de manera local, ya que la administración i.pl. de los antagonistas σ_1 , en la pata contralateral a la inflamación no tuvo efecto antihiperálgico alguno al estimular la pata inflamada (Fig. 5b).

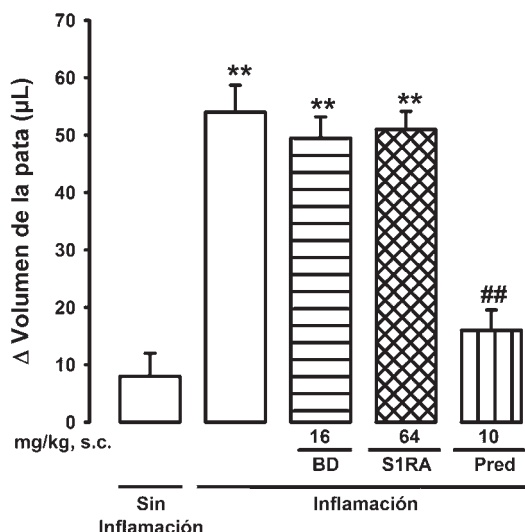


FIGURA 6. Efecto de la inhibición del receptor σ_1 en el edema inflamatorio.

Los resultados muestran el incremento del volumen de la pata en animales tratados con carragenina o su solvente (inflamación y sin inflamación, respectivamente), a los que se le administró BD-1063 (BD), S1RA, prednisona (Pred) o su solvente por vía subcutánea (s.c.). Cada barra y línea vertical muestra la media $\pm$ SEM de los valores obtenidos de 8-10 ratones. Diferencias significativas entre los valores obtenidos de ratones con y sin inflamación: ** $p < 0.01$; y entre ratones con inflamación tratados con Pred o su solvente: ## $p < 0.01$. No hubo diferencias significativas entre los valores de ratones con inflamación tratados con los antagonistas σ_1 o su solvente (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

EFFECTO DEL BLOQUEO DEL RECEPTOR σ_1 EN EL EDEMA INFLAMATORIO

Para estudiar si la inhibición del receptor σ_1 alteraba la formación del edema inflamatorio, evaluamos los efectos de los antagonistas σ_1 en el incremento del volumen de la pata inducido por la administración de carragenina.

La administración i.pl. de salino no modificó el volumen de la pata de los animales inyectados, mientras que la administración de carragenina produjo un marcado edema (Fig. 6). El bloqueo farmacológico del receptor σ_1 por BD-1063 y S1RA, no redujo en absoluto el edema inducido por carragenina, mientras que el corti-

costeroide prednisolona (usado como control positivo), fue capaz de abolir completamente la formación del edema inflamatorio (Fig. 6).

Discusión

En este estudio mostramos que la inhibición del receptor σ_1 revierte la hiperalgesia mecánica y térmica sin afectar al dolor nociceptivo. Además, mostramos que los receptores σ_1 periféricos tienen un importante papel en la importante en la hiperalgesia inflamatoria.

Encontramos que tanto la hiperalgesia mecánica como térmica son revertidas por la administración sistémica de los antagonistas selectivos σ_1 BD-1063 y S1RA. El efecto de los antagonistas σ_1 fue abolido por la administración del agonista PRE-084, lo que confirma que este efecto antihiperalgesico se debe al bloqueo selectivo de los receptores σ_1 . Pese al marcado efecto antihiperalgésico de los antagonistas σ_1 , estos carecen de efectos antinociceptivos en animales sin inflamación. La ausencia de actividad de los antagonistas σ_1 en el dolor normal coincide con datos previamente publicados [9, 10, 21, 23, 24].

La inhibición farmacológica del receptor σ_1 no alteró el desarrollo del edema inducido por carragenina. Esto indica que los efectos antihiperalgesicos del bloqueo de los receptores σ_1 no se acompañan de un efecto antiinflamatorio.

Nuestros resultados aquí presentados muestran que la administración del agonista PRE-084 en la pata inflamada (pero no en la pata no inflamada) revirtió el efecto de la administración sistémica de los antagonistas σ_1 tanto en la hiperalgesia mecánica como térmica. Estos datos sugieren que el efecto antihiperalgesico que se produce por el bloqueo del receptor σ_1 tiene lugar en el foco inflamatorio. Además, la administración de BD-1063 y S1RA en la pata inflamada (pero no en la pata contralateral a la inflamación) es suficiente como para revertir completamente la hiperalgesia mecánica inflamatoria. Estos datos sugieren que el receptor σ_1 en el lugar de la inflamación juega un papel muy importante en la hiperalgesia inflamatoria. Datos recientes muestran que el receptor σ_1 es capaz de interactuar con una gran variedad de receptores y canales iónicos en condiciones de estrés celular [16 y 29], por lo que no sería descabellado pensar que el receptor σ_1 interaccione con dianas moleculares importantes en las transducción de los estímulos mecánicos y térmicos en el lugar de la inflamación. Otra posibilidad es que los receptores σ_1 modulen la señalización de ciertos algógenos químicos que se liberan durante el proceso inflamatorio. De hecho, se ha descrito que la activación del receptor σ_1 incrementa la señalización de bradiquinina, un algógeno que es liberado durante el proceso inflamatorio [11, 14]. Estas hipótesis podrían ser exploradas en el futuro.

En conclusión, el receptor σ_1 juega un importante papel en la hiperalgesia inflamatoria al facilitar la sensibilización frente a los estímulos sensoriales en el

lugar de la inflamación, y que el bloqueo de la función del receptor σ_1 en el tejido inflamado es suficiente para eliminar la hiperalgesia. Por lo tanto, el receptor σ_1 periférico podría ser una nueva diana para el tratamiento del dolor inflamatorio.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por la Secretaría General de Economía y Competitividad de España (SAF2013-47481), Ministerio Español de Educación y Ciencia (SAF2010-15343), la Junta de Andalucía (Grupo CTS-109), CEI BioTic Granada, fondos FEDER, Laboratorios Esteve, el Centro Español de Desarrollo Tecnológico e Industrial (proyecto Genius Pharma), Ministerio Español de Ciencia e Innovación (mediante una beca de Formación de Profesorado Universitario a C. Sánchez-Fernández), y por el Plan de Investigación de la Universidad de Granada (E.J. Cobos y M.A. Tejada).

Referencias

1. Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoaí M, Maurice T. Immunocytochemical localization of the sigma1 receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 2000; 97:155-170.
2. Bangaru ML, Weihrauch D, Tang QB, Zoga V, Hogan Q, Wu HE. Sigma-1 receptor expression in sensory neurons and the effect of painful peripheral nerve injury. *Mol Pain* 2013; 9:47.
3. Chien CC, Pasternak GW. Selective antagonism of opioid analgesia by a sigma system. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271:1583-1590.
4. Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendán CM, Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of σ_1 receptor ligands. *Curr Neuropharmacol* 2008; 6:344-366.
5. Cobos EJ, Portillo-Salido E. "Bedside-to-bench" behavioral outcomes in animal models of pain: beyond the evaluation of reflexes. *Curr Neuropharmacol* 2013; 11:560-591.
6. De la Puente B, Nadal X, Portillo-Salido E, Sánchez-Arroyos R, Ovalle S, Palacios G, Muro A, Romero L, Entrena JM, Baeyens JM, López-García JA, Maldonado R, Zamanillo D, Vela JM. Sigma-1 receptors regulate activity-induced spinal sensitization and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain* 2009; 145:294-303.
7. Díaz JL, Cuberes R, Berrocal J, Contijoch M, Christmann U, Fernández A, Port A, Holzén J, Buschmann H, Laggner C, Serafini MT, Burgueño J, Zamanillo D, Merlos M, Vela JM, Almansa C. Synthesis and biological evaluation of the 1-arylpyrazole class of σ_1 receptor antagonists: identification of 4-{2-[5-methyl-1-(naphthalen-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl]oxy}ethyl}morpholine (S1RA, E-52862). *J Med Chem* 2012; 55:8211-8224.

8. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 2010; 120:3760-3772.
9. 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.
10. 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* 2009; 205:21-33.
11. Hayashi T, Maurice T, Su TP. Ca²⁺ signaling via σ_1 -receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca²⁺ concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293:788-798.
12. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Drugs* 2004; 18:269-284.
13. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell* 2007; 131:596-610.
14. Hong W, Nuwayhid SJ, Werling LL. Modulation of bradykinin-induced calcium changes in SH-SY5Y cells by neurosteroids and sigma receptor ligands via a shared mechanism. *Synapse* 2004; 54:102-110.
15. Kitaichi K, Chabot JG, Moebius FF, Flandorfer A, Glossmann H, Quirion R. Expression of the purported sigma1 (σ_1) 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; 20:75-387.
16. Kourrich S, Su TP, Fujimoto M, Bonci A. The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trends Neurosci* 2012; 35:762-771.
17. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 2009; 10:895-926.
18. Mei J, Pasternak GW. σ_1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300:1070-1074.
19. Mei J, Pasternak GW. Modulation of brainstem opiate analgesia in the rat by sigma 1 receptors: a microinjection study. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322:1278-1285.
20. Menéndez L, Lastra A, Meana A, Hidalgo A, Baamonde A. Analgesic effects of loperamide in bone cancer pain in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81:114-121.
21. Nieto FR, Cendán CM, Sánchez-Fernández C, Cobos EJ, Entrena JM, Tejada MA, Zamanillo D, Vela JM, Baeyens JM. Role of sigma-1 receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *J Pain* 2012; 13:1107-1121.
22. Park H, Kim YH, Chang HW, Kim HP. Anti-inflammatory activity of the synthetic C-C biflavonoids. *J Pharm Pharmacol* 2008; 58:1661-1667.
23. Romero L, Zamanillo D, Nadal X, Sánchez-Arroyos R, Rivera-Arconada I, Dordal A, Montero A, Muro A, Bura A, Segalés C, Laloya M, Hernández E, Portillo-Salido E, Escriche M, Codony X, Encina G, Burgueño J, Merlos M, Baeyens JM, Giraldo J, López-García JA, Maldonado R, Plata-Salamán CR, Vela JM. Pharmacological properties of

- S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *Br J Pharmacol* 2012; 166:2289-2306.
24. Sánchez-Fernández C, Nieto FR, González-Cano R, Artacho-Cordón A, Romero L, Montilla-García Á, Zamanillo D, Baeyens JM, Entrena JM, Cobos EJ. Potentiation of morphine-induced mechanical antinociception by σ_1 receptor inhibition: role of peripheral σ_1 receptors. *Neuropharmacology* 2013; 70:348-358.
 25. Sánchez-Fernández C, Montilla-García A, González-Cano R, Nieto FR, Romero L, Artacho-Cordón A, Montes R, Fernández-Pastor B, Merlos M, Baeyens JM, Entrena JM, Cobos EJ. Modulation of μ -opioid analgesia by peripheral σ_1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 348:32-45.
 26. Sandkühler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 2009; 89:707–758.
 27. Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 2002; 5:1062-1067.
 28. Woolf CJ. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* 2004; 140:441-451.
 29. Zamanillo D, Romero L, Merlos M, Vela JM. Sigma 1 receptor: a new therapeutic target for pain. *Eur J Pharmacol* 2013; 716(1-3):78-93.



Mecanismos moleculares implicados en la formación de la memoria de reconocimiento gustativa

Gómez-Chacón B, Gallo

Resumen

La memoria gustativa posee una gran importancia en el mundo animal en relación con la supervivencia y representa un modelo experimental especialmente adecuado para el estudio de los mecanismos moleculares de la memoria. En función de experiencias previas, permite distinguir sabores familiares y seguros, de novedosos y potencialmente peligrosos, regulando la ingestión. Cuando no aparecen consecuencias viscerales negativas, se produce la formación de una memoria gustativa segura y se incrementa el consumo.

En este trabajo se revisan, la evidencia disponible en roedores acerca de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la formación de la memoria gustativa con especial hincapié en la memoria gustativa segura. El proceso de consolidación de la memoria gustativa implica cambios plásticos en un circuito neural que incluye amígdala, corteza insular y corteza perirrinal, entre otras áreas cerebrales. Además del papel crítico de las vías glutamatérgicas, diversas fases del proceso implican la participación de otros neurotransmisores, tales como, acetilcolina, dopamina y GABA. Los datos existentes apuntan a la relevancia de la cascada MAPK/ERK y a la participación crítica de diversas PKCs, con un papel importante de PKM-zeta para el mantenimiento de la memoria gustativa.

En conjunto los resultados, aunque escasos en lo que se refiere a la memoria gustativa segura, apoyan la existencia de mecanismos moleculares compartidos entre diversos tipos de memoria. Dado que se hace evidente la necesidad de más investigación en el tema, se propone el empleo de la memoria gustativa segura en roedores como modelo.

Mecanismos moleculares de la memoria de reconocimiento gustativa

La exposición a estímulos desconocidos induce una respuesta peculiar de orientación que favorece su procesamiento. En el caso de sabores novedosos se desencadena una respuesta de neofobia que reduce el consumo, siendo ésta una respuesta

adaptativa que protege de envenenamientos o consecuencias adversas potenciales. Dicha respuesta neofóbica al sabor desaparece a medida que éste se convierte en familiar y su ingestión no va seguida de consecuencias nocivas. El incremento en el consumo de sabores conocidos se debe a la atenuación de la respuesta neofóbica. Así, el proceso de atenuación de la neofobia es el reflejo de la formación de una memoria gustativa segura que ha sido propuesta como un tipo de memoria de reconocimiento [1]. El protocolo experimental empleado para estudiar la memoria gustativa segura en modelos animales requiere la privación de agua y la presentación del sabor, habitualmente diluido en agua, en sesiones diarias. Un análisis detallado del procedimiento puede encontrarse en Gómez-Chacón y Gallo [2]. Brevemente, el procedimiento requiere al menos dos exposiciones en días consecutivos de manera que el consumo se incremente significativamente en la segunda presentación con respecto a la primera. Se trata, por tanto, de un protocolo especialmente fácil de aplicar por su rapidez de adquisición y la facilidad en el control de los estímulos, características que lo hacen idóneo para el análisis de los mecanismos moleculares de la memoria [3].

De igual manera que ha sucedido con otros tipos de memoria, el avance en los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares de este tipo de memoria se ha beneficiado de la utilización de modelos de plasticidad sináptica tales como el fenómeno fisiológico de potenciación a largo plazo (LTP) [4] que ha sido relacionado con la consolidación de los recuerdos. La inducción de LTP requiere la participación de receptores de membrana glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) y α -animo-3-hidroxy-5-methylisoxazolepropionate (AMPA). Ello induce señales intracelulares que se van amplificando a través de las proteínas quinasas y en último extremo activan a los factores de transcripción, modificando por una parte la respuesta de los receptores de membrana y por otra, la expresión génica para inducir plasticidad a largo plazo. El fenómeno LTP ha sido especialmente estudiado en el hipocampo (HC) debido por una parte a la naturaleza accesible del circuito trisináptico de la formación hipocampal que puede estudiarse tanto *in vivo* como *in vitro* y por otra al papel crítico que juegan la formación hipocampal y estructuras relacionadas del lóbulo temporal en diversos tipos de memoria espacial y de reconocimiento visual, clasificadas como memoria declarativa (Figura 1). Así, se acepta que la expresión génica, la síntesis de nuevas proteínas y los cambios morfológicos asociados son necesarios también para el tipo de plasticidad sináptica subyacente a la consolidación de la memoria. Con respecto a la memoria gustativa, en primer lugar se ha descrito LTP mediada por receptores glutamatérgicos en áreas no hipocampales relacionadas tradicionalmente con la formación de la memoria gustativa, tales como la corteza insular (IC) y la amígdala (AM). En segundo lugar, no puede descartarse la participación del hipocampo y áreas temporales tales como la corteza perirrinal en la memoria gustativa como indican estudios previos [5, 6]. Por ello, el estudio de los mecanismos moleculares de la memoria de reconocimiento gustativa se beneficia de estos planteamientos.

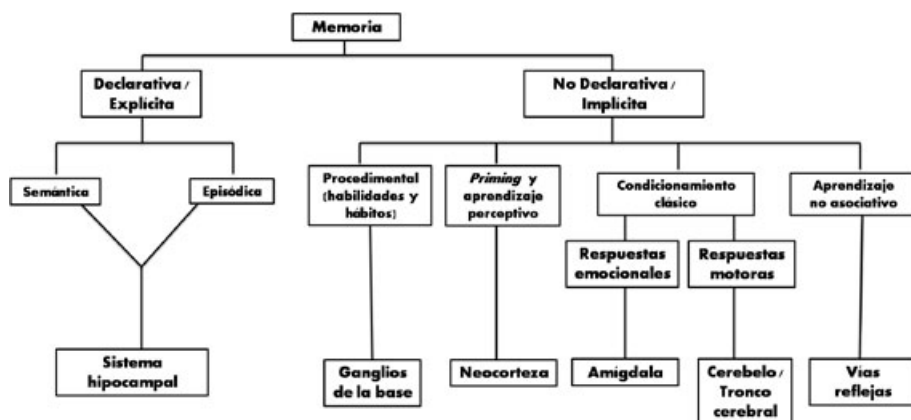


FIGURA 1. Propuesta de clasificación de los tipos de memoria a largo plazo en mamíferos. Modificado de Squire [92].

Teoría de la consolidación, memoria a largo plazo y mecanismos celulares

La teoría de la consolidación de la memoria, propuesta por Müller y Pilzecker en 1900 [7], planteaba que los recuerdos inicialmente persisten en un estado lábil y se van estabilizando lentamente a lo largo del tiempo [8]. La teoría estaba apoyada inicialmente por estudios con seres humanos en los que la adquisición de nueva información interfiere con el recuerdo de aquella aprendida recientemente. Posteriormente, la teoría sirvió para explicar la aparición de amnesia retrógrada como consecuencia del daño cerebral y de la aplicación de electroshock en pacientes, de modo que únicamente resultaban afectados los recuerdos relativamente recientes pero no los antiguos bien consolidados. Como indica en su revisión de la evolución de la teoría a lo largo del siglo XX [8], la propuesta de Hebb y Gerard en 1949 [9,10] acerca de la existencia de dos estados de memoria haciendo referencia a una memoria a corto plazo que da lugar a la memoria a largo plazo, fue apoyada inicialmente por la posibilidad de eliminar recuerdos recientes pero no antiguos mediante la inhibición de la síntesis de proteínas en modelos animales. Los presupuestos fundamentales de la teoría se mantienen en vigor hoy en día ya que una variedad de estudios en animales muestran la posibilidad de interferir o favorecer la consolidación de la memoria aplicando tratamientos farmacológicos en un periodo de tiempo posterior al entrenamiento que va desde segundos hasta horas [11]. La discusión actual radica en el número de etapas disociables durante el proceso de consolidación y reconsolidación [12], etapas que parecen estar organiza-

das en paralelo y no secuencialmente como inicialmente se propuso dada la posibilidad de actuar experimentalmente sobre ellas de forma independiente.

La evolución de la teoría de la consolidación se ha beneficiado de los planteamientos asociados tanto a la hipótesis de los múltiples sistemas de memoria como a la hipótesis que asocia la plasticidad sináptica a la memoria (revisado en [13]). Por un lado, la idea de que la memoria no es una facultad unitaria sino que es posible distinguir entre diversos tipos de memoria disociables surgió a partir de la evidencia clínica con pacientes amnésicos con daño hipocampal que mostraban preservada la capacidad de aprender y retener información, aunque no fueran conscientes de ello. Los estudios de Brenda Milner con el paciente H.M. fueron paradigmáticos en este sentido (para una revisión [14]). Hoy en día se acepta que la adquisición, consolidación y recuperación de los recuerdos requiere la orquestación de circuitos neurales que involucran diversas áreas dependiendo del tipo de memoria de que se trate. Aunque existen diversas propuestas, predominan las clasificaciones que distinguen entre memoria dependiente del hipocampo versus memorias no hipocampales [13, 15].

Independientemente de la clasificación propuesta a la hora de organizar los tipos de memoria, se acepta que la consolidación de la memoria requiere un complejo entramado de circuitos cerebrales que sufren modificaciones inducidas por la experiencia tanto en serie como en paralelo. Por otra parte, la hipótesis que asocia plasticidad sináptica y memoria se origina en la teoría de Donald Hebb y domina los planteamientos actuales que dirigen el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de la memoria. La hipótesis plantea que son las modificaciones en el número y fuerza de determinadas sinapsis en las estructuras que forman los mencionados circuitos las que codifican y almacenan la información. Así, la formación de recuerdos implica cambios en la conectividad de los circuitos de memoria que dependen de las capacidades plásticas de las neuronas. En este sentido Donald Hebb desarrolló una amplia teoría fisiológica para explicar el comportamiento humano, proponiendo el patrón de actividad de grupos de neuronas o “asamblea celular” como unidad funcional. En su teoría el aprendizaje y la memoria se basan en el establecimiento de patrones de actividad en circuitos neuronales. Estos patrones de actividad implican cambios más o menos permanentes en la fuerza de las conexiones, siendo la variable relevante la contigüidad temporal. De esta forma, grupos de neuronas que son activadas consistentemente al mismo tiempo o en una relación temporal determinada se asocian formando un patrón de actividad que tiende a reproducirse cuando una de ellas es activada [16]. En la actualidad se están desentrañando los mecanismos moleculares responsables de estos cambios que, en último extremo, producen alteraciones en la liberación del neurotransmisor así como cambios funcionales y morfológicos en la estructura de la sinapsis [17, 18].

De nuevo, buena parte de la investigación se ha centrado en las propiedades plásticas de las sinapsis glutamatérgicas hipocampales. De hecho, se han relacionado con determinados tipos de memoria modelos de plasticidad sináptica identificados inicialmente en la formación hipocampal tales como los fenómenos fisio-

lógicos de potenciación a largo plazo (LTP) [4] o depresión a largo plazo (LTD). El hecho de que parezcan existir mecanismos celulares y moleculares compartidos entre estos fenómenos y procesos de aprendizaje y memoria de muy distinta naturaleza ha permitido grandes avances en la actualidad. Así, los datos apoyan la existencia de mecanismos comunes conservados a través de la evolución por los que la experiencia modula la plasticidad sináptica para almacenar diversas memorias (sensibilización versus memoria espacial) en distintos niveles de organización del sistema nervioso (circuito sensorial versus hipocampo) y distintas especies (*Aplysia* versus ratón) [19]. Por ello, la investigación de los procesos implicados en LTP ha resultado crucial para comprender la formación de los circuitos de memoria.

Mecanismos moleculares de la potenciación a largo plazo como modelo de plasticidad sináptica

La inducción del fenómeno de potenciación a largo plazo, que, en último extremo, conlleva una alteración de la actividad postsináptica y/o presináptica, provocando un incremento de respuesta sináptica específica, requiere un incremento de la concentración de calcio dependiente de la activación del receptor glutamatérgico NMDA, que a su vez inicia procesos de señalización intracelular calcio-dependientes [20]. Se ha demostrado que los receptores glutamatérgicos, tipo NMDA, son esenciales para la iniciación del fenómeno de LTP. Se trata de receptores que detectan las relaciones entre los *inputs* que la célula recibe, siendo especialmente sensibles a determinadas condiciones de estimulación, tales como la estimulación de alta frecuencia y la estimulación asociativa en la que un estímulo de menor intensidad o eficacia precede a otro de mayor intensidad o eficacia con unos precisos parámetros temporales. Durante la transmisión sináptica de baja frecuencia el glutamato se une tanto al receptor NMDA como al AMPA. La activación de los receptores AMPA es responsable de la despolarización de la membrana. Los receptores NMDA, aunque son permeables al Ca^{2+} , poseen un bloqueo voltaje-dependiente por el ión Mg^{2+} . Es necesaria la despolarización previa de la membrana para la expulsión del Mg^{2+} por repulsión de cargas, permitiendo la entrada de calcio. Así, un estímulo o *input* puede despolarizar la membrana permitiendo que el *input* posterior active a los receptores NMDA aunque la despolarización que indujo no haya alcanzado el umbral para producir un potencial de acción.

Las consecuencias de la activación de los receptores NMDA son múltiples pero en cualquier caso incrementan o potencian el efecto que el estímulo inicial induce en la célula. El incremento intracelular de la concentración de calcio produce la activación de quinasas dependientes de calcio (MAPKs, SAPKs, MAPKAKs, p38MAPK, etc.). Una vez activadas, por una parte fosforilan a los receptores AMPA aumentando así la sensibilidad al glutamato y por otra parte, fosforilan factores de transcripción expresados constitutivamente, tal como AMPC RESPONSE ELEMENT BIN-

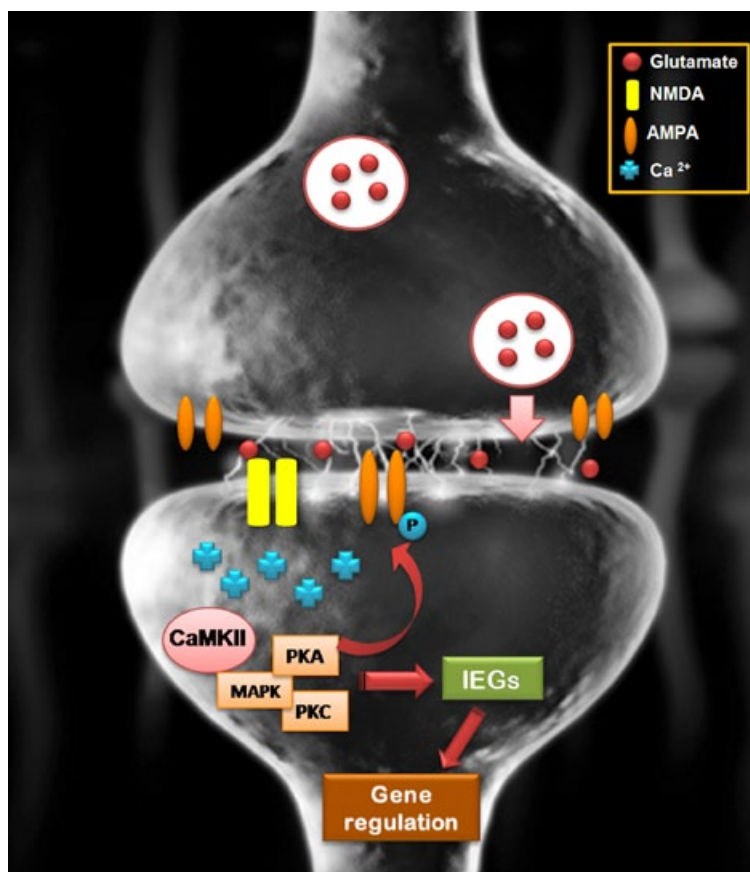


FIGURA 2. Representación esquematizada de la sinapsis glutamatergica, en la que únicamente se representan los receptores de membrana NMDA y AMPA.

El glutamato liberado se une a dichos receptores y provoca una entrada de iones de calcio. Este incremento de la concentración de calcio en el interior de la célula induce la activación de las proteínas quinasas que por una parte producen efectos inmediatos fosforilando los receptores AMPA y aumentando su sensibilidad al glutamato, y por otra, modifican la expresión génica alterando la neurotransmisión a largo plazo. Los mecanismos presinápticos implicados en dicho proceso no se han representado.

DING (CREB). Estos, a su vez, regulan tanto factores de transcripción inducibles, tales como *c-Fos*, *zif268*, *Arc*, etc., como genes de respuesta tardía que codifican receptores, sinapsinas y proteínas estructurales que producen cambios funcionales y estructurales en las sinapsis [21] (Figura 2).

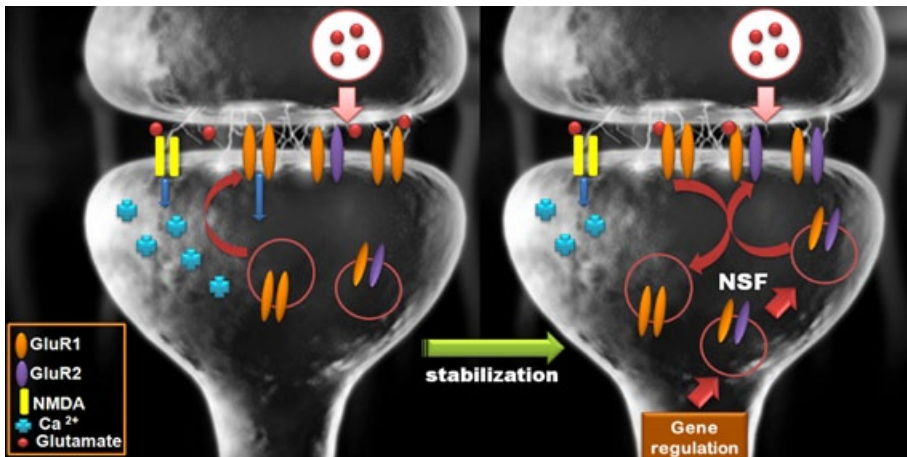


FIGURA 3. Representación del tráfico de las subunidades de los receptores AMPA mediado por NSF.

Durante la neurotransmisión se produce una incorporación rápida de los receptores carentes de GluR2 y por lo tanto permeables al calcio. Esta incorporación es transitoria y son reemplazados por los receptores AMPA con GluR2. Este tráfico de subunidades está mediado, entre otras, por la proteína N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF).

Así, el mantenimiento y la expresión de LTP requieren la participación de los receptores AMPA. El tráfico postsináptico de los receptores AMPA posee un papel crucial en la regulación de la fuerza sináptica [22, 23] así como en la estabilización de LTP. Los receptores AMPA están formados por cuatro subunidades: GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4, que se combinan formando tetrámeros. La subunidad GluR2 es crítica ya que determina las propiedades biofísicas de los receptores AMPA, tales como la cinética [24], la conductancia [25], el bloqueo por poliaminas endógenas [26] y la permeabilidad al calcio [27]. Esta permeabilidad, es baja cuando los receptores AMPA presentan GluR2. Esto es debido a un proceso de edición del ARNm de esta subunidad que provoca la sustitución de un aminoácido neutro, glutamina, por una arginina cuya carga positiva impide el paso del ión calcio. Cuando se induce LTP se produce una rápida incorporación en la sinapsis de los receptores AMPA carentes de GluR2 y por lo tanto, permeables al calcio. Esta incorporación es transitoria y son reemplazados por los receptores AMPA con GluR2 después de la inducción del LTP [28] (Figura 3).

Tanto la migración de los receptores AMPA a la zona sináptica como su retirada, influyen en la eficacia de la sinapsis durante el mantenimiento de LTP [29, 30, 31]. Se ha propuesto que existe un tráfico controlado de estos receptores desde las zonas no sinápticas hasta los sitios de sinápsis [32, 33, 34, 35, 36, 37]. Se trata

de un proceso basado en la interacción entre proteínas intracelulares con regiones específicas del dominio C-terminal de la subunidad GluR2 [33]. En particular, destaca la interacción entre la proteína de fusión N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) con GluR2, siendo crucial esta unión para la estabilización de los receptores AMPA en la membrana sináptica [33, 34, 35, 36]. NSF es una ATPasa conocida principalmente por el papel que juega en los procesos generales de fusión de membranas [38, 39] y de vesículas con neurotransmisores [40]. Sólo recientemente se ha identificado como una pieza clave en la regulación de los receptores AMPA [41, 34, 35] y en la transmisión sináptica mediada por dichos receptores [33, 34, 35, 36] (Figura 3). De hecho, el papel propuesto para la proteína PKMzeta en el mantenimiento de LTP [42] parece estar mediado por su acción persistente sobre la interacción NSF/GluR2 impidiendo la eliminación de los receptores NMDA que contienen GluR2 [43]. Así, el bloqueo de la interacción entre NSF/GluR2 mediante pep2m impide la persistencia de LTP una hora después de inducirla e invierte el efecto 3 y 5 horas después [44].

Neurotransmisores y memoria de reconocimiento gustativa

Aunque más estudiado en el hipocampo, el fenómeno LTP ha sido descrito en una variedad de áreas cerebrales incluyendo las que forman parte del circuito neural responsable de la memoria gustativa. Así, ha sido descrito en la amígdala [45, 46, 47] y en la corteza insular [48, 49]. En IC la adquisición de aversiones gustativas condicionadas induce LTP [50]. En este circuito sensorial la transmisión glutamatérgica juega un papel relevante desde los primeros relevos de la información gustativa procedente de la cavidad oral en el tronco cerebral [51] hasta la corteza gustativa [50] y la amígdala [52]. Efectivamente, los receptores NMDA parecen estar implicados tanto en la formación de la memoria gustativa aversiva [53, 54, 55, 56] como en el proceso de atenuación de la neofobia [57, 58, 59] aunque no siempre la implicación de los receptores NMDA con este tipo de memoria es directa [60].

Junto al glutamato, que ha sido el más estudiado, la participación de otros neurotransmisores parece jugar un papel crítico en la memoria gustativa [50]. Así, se ha relacionado la respuesta a la novedad del sabor con incrementos en los niveles de acetilcolina en IC [61] mientras que la inactivación del núcleo basal magnocefalo, origen de fibras colinérgicas, interfiere con la adquisición de aversiones gustativas condicionadas [62]. Por otro lado, estudios que han empleado triple marcaje para identificar la activación de interneuronas GABAérgicas en IC han demostrado actividad específica asociada a la presentación de estímulos novedosos en las capas profundas de la corteza insular disgranular [63].

La coparticipación de otros sistemas de neurotransmisión durante la adquisición, mantenimiento y consolidación de memorias gustativas, ya sean aversivas, apetitivas

o seguras, ha sido descrita en otras áreas que forman parte del sistema gustativo. Así, se ha demostrado que la adquisición de preferencias gustativas condicionadas requiere la co-activación de receptores NMDA y dopaminérgicos [52], en aversión gustativa condicionada y en atenuación de la neofobia [64].

Procesos intracelulares y memoria de reconocimiento gustativa

De acuerdo con la propuesta de considerar el fenómeno LTP como modelo de los cambios plásticos subyacentes a la memoria, se han identificado una serie de mecanismos moleculares compartidos entre dicho fenómeno y la memoria gustativa. Entre otras cascadas de acontecimientos intracelulares destaca la mediada por la vía enzimática MAPK/ERK. La actividad del grupo ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) de la familia MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) en IC y AM parece ser necesaria para distintas formas de memoria, incluyendo memoria de reconocimiento gustativa [50, 65, 66]. Como revisan Adaikkan y Rosenblum [65], estudios previos demuestran que la memoria de reconocimiento gustativa segura (también denominada *novel-taste learning* por estos autores) induce la fosforilación y activación de diversos miembros de la vía MAPK. Efectivamente, el inicio del proceso de atenuación de la neofobia gustativa durante el segundo día de exposición, pero no la presentación de un sabor completamente familiar después de cuatro exposiciones, incrementa la activación de ERK1/II. Otras familias de quinasas cuya activación en el núcleo parabraquial [67, 68, 69], IC [48] y AM [70, 71] parece ser necesaria para la memoria gustativa, especialmente para la adquisición de aversiones gustativas condicionadas, son Ca^{2+} /phospholipid-dependent protein kinase (PKC), cAMP-dependent protein kinase (PKA) y Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CamKII).

Estas quinasas fosforilan directa o indirectamente al factor de transcripción CREB (cAMP-response-element binding protein) lo que hace que se una a CRE (cAMP-response-element) que a su vez se liga a CBP (CREB-binding protein) formando un complejo que regula la transcripción de determinados genes tal como *c-fos* entre otros genes inmediatos tempranos [65]. Por una parte, aunque los datos son escasos, se ha informado de incrementos en la activación de CREB en relación con memoria gustativa en el hipocampo [72], IC y AM [73]. Por otra parte, la activación de *c-fos* asociada a la adquisición de aversiones gustativas condicionadas se ha descrito en IC [63, 74, 75] y AM [76, 77, 78].

Mención especial merece la isoforma atípica de PKC denominada PKMzeta que muestra actividad auto-mantenida debido a la carencia de la subunidad reguladora. A diferencia de otras quinasas cuya contribución a la consolidación de la memoria parece limitada a una ventana temporal durante el proceso de estabilización, la actividad persistente de PKMzeta ha sido propuesta como el mecanismo responsable de mantener los cambios sinápticos y los recuerdos a largo

plazo de manera permanente [79]. Aunque recientemente han surgido posturas críticas con este planteamiento [80, 81] se ha acumulado gran cantidad de evidencia que apoya el papel crítico de PKMzeta en diversas áreas cerebrales para el mantenimiento de LTP y memoria espacial [43], así como de diversos tipos de memorias clasificadas tanto como declarativas como no declarativas [82, 83, 84, 85]. Del mismo modo, la actividad de PKMzeta en el hipocampo dorsal es necesaria para la memoria de reconocimiento de la localización de un objeto [86] y resulta alterada por la familiaridad del contexto [87]. Con respecto a la memoria gustativa, la actividad de PKMzeta en IC se ha relacionado repetidamente con el mantenimiento de aversiones gustativas aprendidas [88, 89, 90] y nuestro grupo ha obtenido datos que apoyan la participación de la actividad de PKMzeta en AM en el mantenimiento de la memoria gustativa durante la adquisición de aversiones aprendidas [91].

Bibliografía

1. Bermudez-Rattoni F. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci.* 2004, 5: 209-17.
2. Gómez-Chacón B, Gallo M. Memoria de reconocimiento visual y gustativa: comparación entre procesos y mecanismos. En: Gámiz F, Gallo M. & Vives F. (eds) *Encuentros en Neurociencias Vol. II.* Granada: Ciber, 2013, p. 123-47.
3. Gómez-Chacón B, Gámiz F, Gallo M. Basolateral amygdala lesions attenuate safe taste memory-related c-fos expression in the rat perirhinal cortex. *Behav Brain Res.* 2012, 230: 418-22.
4. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973, 232: 331-56.
5. Gallo M, Ballesteros MA, Molero A, Morón I. Taste aversion learning as a tool for the study of hippocampal and non-hippocampal brain memory circuits regulating diet selection. *Nutr Neurosci.* 1999, 2: 277-302.
6. Manrique T, Moron I, Ballesteros MA, Guerrero RM, Fenton AA, Gallo M. Hippocampus, aging, and segregating memories. *Hippocampus.* 2009, 19: 57-65.
7. Müller GE, Pizecker A. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z. Psychol. Ergänzungsband (Experimental contributions to the science of memory).* 1900, 1: 1-300.
8. McGaugh JL. Memory: A century of consolidation. *Science.* 2000, 287: 248-51.
9. Gerard RW. Physiology and psychiatry. *Amer J Psychiat.* 1949, 105: 161-73.
10. Hebb, D. *The Organization of Behavior.* New York: Wiley & Sons. 1949.
11. Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, deDavid e Silva T, Choi H, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol.* 2002, 22: 269-87.
12. Sara SJ, Hars B. In memory of consolidation. *Learn Mem.* 2006, 13: 515-21.

13. Colombo PJ. Learning-induced activation of transcription factors among multiple memory systems. *Neurobiol Learn Mem.* 2004, 82: 268-77.
14. Milner B. The medial temporal-lobe amnesic syndrome. *Psychiatr Clin North Am.* 2005, 28: 599-611.
15. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 2004, 82:171-7.
16. Neel A. Theories of psychology: a handbook. Schenkman Publishing Co., Cambridge,MA. Ornstein, R. 1986. *Multimind.* Houghton Mifflin Co., Boston.
17. Izquierdo I, Bevilacqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.* 2006, 29: 496-505.
18. Middei S, Ammassari-Teule M, Marie H. Synaptic plasticity under learning challenge. *Neurobiol Learn Mem.* 2014, in press.
19. Barco A, Bailey CH, Kandel ER. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem.* 2006, 97:1520-33.
20. Coogan AN, O'Neill LA, O'Connor JJ. The P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 antagonizes the inhibitory effects of interleukin-1beta on long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience.* 1999, 93: 57-69.
21. Lechner HA, Squire LR, Byrne JH. 100 years of consolidation-remembering Müller and Pilzecker. *Learn Mem.* 1999, 6: 77-87.
22. Anggono V, Huganir RL. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 2012, 22:461-69.
23. Bassani S, Folci A, Zapata J, Passafaro M. AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cell Mol Life Sci.* 2013, 70:4411-30.
24. Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron.* 1995, 15: 193-204.
25. Swanson GT, Kamboj SK, Cull-Candy SG. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J Neurosci.* 1997, 17: 58-69.
26. Bowie D, Mayer ML. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron.* 1995, 15: 453-62.
27. Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron.* 1992, 8: 189-98.
28. Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron.* 2007, 54: 859-71.
29. Barry MF, Ziff EB. Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol.* 2002, 12: 279-86.
30. Song I, Huganir RL. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 2002, 25: 578-88.

31. Kessels HW, Malinow R. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron*. 2009, 61: 340–50.
32. Lynch G, Baudry M. The biochemistry of memory: A new and specific hypothesis. *Science*. 1984, 224: 1057-63.
33. Nishimune A, Isaac JT, Molnar E, Noel J, Nash SR, Tagaya M, Collingridge GL, Nakanishi S, Henley JM. NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron*. 1998, 21: 87-97.
34. Song DK, Choe B, Bae JH, Park WK, Han IS, Ho WK, Earm YE. Brain-derived neurotrophic factor rapidly potentiates synaptic transmission through NMDA, but suppresses it through non-NMDA receptors in rat hippocampal neuron. *Brain Res*. 1998, 799: 176-9.
35. Noel J, Ralph GS, Pickard L, Williams J, Molnar E, Uney JB, Collingridge GL, Henley JM. Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron*. 1999, 23: 365-76.
36. Lüscher C, Xia H, Beattie EC, Carroll RC, von Zastrow M, Malenka RC, Nicoll RA. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron*. 1999, 24: 649-58.
37. Malinow R, Mainen ZF, Hayashi Y. LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. *Curr Opin Neurobiol*. 2000, 10: 352-7.
38. Rothman JE. Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1994, 29: 81-96.
39. Whiteheart SW, Rossmagel K, Buhrow SA, Brunner M, Jaenicke R, Rothman JE. N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J Cell Biol*. 1994, 126: 945-54.
40. Schweizer FE, Dresbach T, DeBello WM, O'Connor V, Augustine GJ, Betz H. Regulation of neurotransmitter release kinetics by NSF. *Science*. 1998, 279: 1203-6.
41. Osten P, Srivastava S, Inman GJ, Vilim FS, Khatri L, Lee LM, States BA, Einheber S, Milner TA, Hanson PI, Ziff EB. The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with NSF and alpha- and beta-SNAPs. *Neuron*. 1998, 21: 99-110.
42. 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: 1141-4.
43. 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: 630-4.
44. Yao Y, Kelly MT, Sajikumar S, Serrano P, Tian D, Bergold PJ, Frey JU, Sacktor TC. PKM zeta maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors. *J Neurosci*. 2008, 28: 7820-7.
45. Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res*. 2000, 852: 208-12.
46. Yasoshima Y, Yamamoto T, Kobayashi K. Amygdala-dependent mechanisms underlying memory retrieval of conditioned taste aversion. *Chem Senses*. 2005, 30 Suppl 1:i158-9.

47. Sigurdsson T, Doyère V, Cain CK, LeDoux JE. Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology*. 2007, 52: 215-27.
48. Escobar ML, Alcocer I, Chao V. The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Res*. 1998, 812: 246-51.
49. Gal-Ben-Ari S, Rosenblum K. Molecular mechanisms underlying memory consolidation of taste information in the cortex. *Front Behav Neurosci*. 2012, 5: 87.
50. Rodríguez-Durán LF, Escobar ML. NMDA receptor activation and PKC but not PKA lead to the modification of the long-term potentiation in the insular cortex induced by conditioned taste aversion: differential role of kinases in metaplasticity. *Behav Brain Res*. 2014, 266: 58-62.
51. Bielavska E, Miksik I, Krivanek J. Glutamate in the parabrachial nucleus of rats during conditioned taste aversion. *Brain Res*. 2000, 887: 413-7.
52. Touzani K, Bodnar RJ, Sclafani A. Glucose-conditioned flavor preference learning requires co-activation of NMDA and dopamine D1-like receptors within the amygdala. *Neurobiol Learn Mem*. 2013, 106: 95-101.
53. Welzl H, Alessandri B, Bättig K. The formation of a new gustatory memory trace is prevented by the non-competitive NMDA antagonist ketamine in rats. *Psychobiol*. 1990, 18: 43-7.
54. Aguado L, San Antonio A, Pérez L, Del Valle R, Gómez J. Effects of the NMDA-receptor antagonist ketamine on fear memory: conditioned aversion, latent inhibition and habituation of neophobia. *Behav Neural Biol*. 1994, 61: 271.
55. Walker ML, Scully VM. Disruption of the acquisition of a conditioned taste aversion by the N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801. *Z Psychol*. 1996, 204: 305-13.
56. Ferreira G, Gutierrez R, De La Cruz V, Bermudez R. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci*. 2002, 16: 1139-45.
57. Bermúdez-Rattoni F, Núñez-Jaramillo L, Balderas I. Neurobiology of taste-recognition memory formation. *Chem. Senses*. 2005, Suppl 1: i156-7.
58. Figueroa-Guzmán Y, Kuo JS, Reilly S. NMDA receptor antagonist MK-801 infused into the insular cortex prevents the attenuation of gustatory neophobia in rats. *Brain Res*. 2006; 1114, 183-6.
59. Figueroa-Guzmán Y, Reilly S. NMDA receptors in the basolateral amygdala and gustatory neophobia. *Brain Res*. 2008, 1210: 200-3.
60. Gutierrez R, Rodríguez-Ortiz CJ, De La Cruz V, Nunez-Jaramillo L, Bermudez- Rattoni F. Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem*. 2003, 80: 323-31.
61. Miranda MI, Ramírez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F. Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res*. 2000, 882: 230-5.
62. Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F. Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96: 6478-82.

63. Doron G, Rosenblum K. c-Fos expression is elevated in GABAergic interneurons of the gustatory cortex following novel taste learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2010, 94: 21-9.
64. David O, Barrera I, Chinnakkaruppan A, Kaphzan H, Nakazawa T, Yamamoto T, Rosenblum K. Dopamine-induced tyrosine phosphorylation of NR2B (Tyr1472) is essential for ERK1/2 activation and processing of novel taste information. *Front Mol Neurosci.* 2014, 7: 66.
65. Adaikkan C, Rosenblum K. The role of protein phosphorylation in the gustatory cortex and amygdala during taste learning. *Exp Neurobiol.* 2012; 21: 37-51.
66. Castillo DV, Escobar ML. A role for MAPK and PI-3K signaling pathways in brain-derived neurotrophic factor modification of conditioned taste aversion retention. *Behav Brain Res.* 2011, 217: 248-52.
67. Krivanek J. Conditioned taste aversion and protein kinase C in the parabrachial nucleus of rats. *Neurobiol Learn Mem.* 1996, 65: 154-62.
68. Krivanek J. Protein kinase C in the parabrachial nucleus of rats during conditioned taste aversion induced by amphetamine. *Neurosci Lett.* 1997, 236: 17-20.
69. Krivanek J. Conditioned taste aversion and Ca/calmodulin-dependent kinase II in the parabrachial nucleus of rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2001, 76: 46-56.
70. Lin PY, Wang SP, Tai MY, Tsai YF. Differential involvement of medial prefrontal cortex and basolateral amygdala extracellular signal-regulated kinase in extinction of conditioned taste aversion is dependent on different intervals of extinction following conditioning. *Neuroscience.* 2010, 171: 125-33.
71. Kwon B, Houtp TA. Mitogen-activated protein kinase in the amygdala plays a critical role in lithium chloride-induced taste aversion learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2012, 97: 132-9.
72. Yefet K, Merhav M, Kuulmann-Vander S, Elkobi A, Belevovsky K, Jacobson-Pick S, Meiri N, Rosenblum K. Different signal transduction cascades are activated simultaneously in the rat insular cortex and hippocampus following novel taste learning. *Eur J Neurosci.* 2006, 24: 1434-42.
73. Swank MW. Phosphorylation of MAP kinase and CREB in mouse cortex and amygdala during taste aversion learning. *Neuroreport.* 2000, 11: 1625-30.
74. Wilkins EE, Bernstein IL. Conditioning method determines patterns of c-fos expression following novel taste-illness pairing. *Behav Brain Res.* 2006, 169: 93-7.
75. Bernstein IL, Koh MT. Molecular signaling during taste aversion learning. *Chem Senses.* 2007, 32: 99-103.
76. Lamprecht R, Dudai Y. Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. *Learn Mem.* 1996, 3: 31-41.
77. Yasoshima Y, Scott TR, Yamamoto T. Memory-dependent c-Fos expression in the nucleus accumbens and extended amygdala following the expression of a conditioned taste aversive in the rat. *Neuroscience.* 2006, 141: 35-45.
78. Lin JY, Roman C, Arthurs J, Reilly S. Taste neophobia and c-Fos expression in the rat brain. *Brain Res.* 2012, 1448: 82-8.

79. Sacktor TC. How does PKM ζ maintain long-term memory? *Nat Rev Neurosci.* 2011, 12: 9-15.
80. Kwapis JL, Helmstetter FJ. Does PKM(zeta) maintain memory? *Brain Res Bull.* 2014, 105: 36-45.
81. Volk LJ, Bachman JL, Johnson R, Yu Y, Huganir RL. PKM-z is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature.* 2013, 493: 420-3
82. 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, e318: 2698-706.
83. 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, 20 :253-71.
84. 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, 5:e10400.
85. Von Kraus LM, Sacktor TC, Francis JT. Erasing sensorimotor memories via PKMzeta inhibition. *PLoS One.* 2010, 5: e11125.
86. 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.* 2010, 20: 691-5.
87. Moncada D, Viola H. PKMzeta inactivation induces spatial familiarity. *Learn Mem.* 2008, 15: 810-4.
88. 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: 951-3.
89. Shema R, Hazvi S, Sacktor TC, Dudai Y. Boundary conditions for the maintenance of memory by PKMzeta in neocortex. *Learn Mem.* 2009, 16: 122-8.
90. Shema R, Haramati S, Ron S, Hazvi S, Chen A, Sacktor TC, Dudai Y. Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase Mzeta in the neocortex. *Science.* 2011, 331:1207-10.
91. Gámiz F, Gallo M. Intra-amygdala ZIP injections impair the memory of learned active avoidance responses and attenuate conditioned taste-aversion acquisition in rats. *Learn Mem.* 2011, 18:529-33.
92. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 2004, 82:171-7.



Estado del neurodesarrollo en niños nacidos de madres con sobrepeso, obesidad y diabetes gestacional, durante los primeros 18 meses de vida

**Torres-Espínola FJ, Jerez Calero A,
Segura M^aT, Moreno-Torres R, Padilla C,
Robles C, Cruz-Quintana F, Pérez-García M,
Campoy C.**

Resumen

El periodo de la vida fetal y el comienzo de la infancia se consideran periodos críticos fundamentales para el desarrollo cerebral. Las patologías metabólicas que afectan a la embarazada tales como el sobrepeso, obesidad y diabetes gestacional pueden suponer un riesgo negativo para el desarrollo del cerebro fetal, con las consecuencias derivadas a largo plazo. El objetivo del presente estudio es investigar el efecto del sobrepeso, la obesidad y la diabetes gestacional en las madres sobre el neurodesarrollo de sus hijos hasta los 18 meses de edad. El estudio PREOBE es un estudio prospectivo de cohorte en el que se han evaluado 331 parejas “madre-hijo” reclutadas en los Hospitales Clínico San Cecilio y Materno-Infantil de Granada. Las madres fueron captadas entre las semanas 12 y 20 de gestación, y divididas en cuatro grupos dependiendo del índice de masa corporal (IMC) pre-gestacional o del desarrollo de diabetes gestacional; así, se incluyeron los siguientes grupos, sobrepeso (n:56), obesas (n:64), diabetes gestacional (n:79), y embarazadas sanas normo-peso (n:132) como grupo control. A los 6 y 18 meses fueron evaluados sus hijos mediante las escalas de neurodesarrollo de Bayley versión III. A los 6 meses de edad, los bebés nacidos de madres obesas mostraron la puntuación cognitiva compuesta ($P=0.023$) y puntuación del lenguaje compuesta ($P=0.011$) más altas que aquellos niños nacidos de las madres sanas del grupo control. El estudio de regresión bivariable, ajustado por variables confusoras, mostró para los hijos de madres obesas una OR de 3.3 (95% IC: 1.1, 10.0; $P=0.035$) para la puntuación del lenguaje compuesta. Sin embargo, a los 18 meses de edad, tras aplicar de nuevo un modelo de regresión bivariable, se observó en estos niños un incremento del riesgo de tener puntuaciones más bajas en motricidad gruesa (OR: 0.354; 95% IC:0.142-0.878, $P=0.025$) y también en los nacidos de madres diabéticas (OR: 0.405; 95% IC:0.193-0.850, $P=0.017$), respecto a los hijos de madres del grupo control. Los hijos de madres diabéticas

también mostraron un mayor riesgo de tener puntuaciones por debajo de la mediana en la escala de lenguaje expresivo (OR: 0.359, 95% IC: 0.147-0.877, $P=0.025$) y de lenguaje compuesto (OR: 0.442, 95% IC: 0.212-0.922, $P=0.030$). Los resultados del presente estudio sugieren que los hijos de madres con patologías metabólicas difieren en su perfil evolutivo de neurodesarrollo respecto con el grupo control. Los hijos de mujeres obesas tienen un desarrollo cognitivo y del lenguaje acelerado durante los primeros 6 meses respecto a los hijos de madres sanas; este efecto se diluye en el tiempo, ralentizándose para llegar a los 18 meses con un desarrollo cognitivo y del lenguaje similar a los niños nacidos de madres con normopeso. Sin embargo, el desarrollo de la motricidad gruesa se ve afectado a los 18 meses en los hijos de embarazadas obesas. Los hijos de madres diabéticas muestran un fallo en el neurodesarrollo motor y del lenguaje a los 18 meses de edad respecto a los niños nacidos de madres sanas. Se requieren más estudios para confirmar estos datos y cuáles son los mecanismos fisiológicos implicados.

Introducción

Durante los últimos años, las tasas de obesidad y diabetes han experimentado un crecimiento excepcional en el mundo desarrollado; de forma paralela, se están incrementando los estudios de cómo estas enfermedades afectan a la salud humana [1, 2]. Está bien establecido que el exceso de peso antes del embarazo y una rápida ganancia de peso durante la gestación pueden determinar un mayor riesgo de desarrollo de diabetes gestacional [3], incrementando el riesgo de enfermedades crónicas de forma más tardía en sus hijos [4]. Se ha observado una interacción de la diabetes gestacional, el sobrepeso y la obesidad pre-gestacionales, sobre el estado de micronutrientes en los hijos, aumento de medidas antropométricas y composición corporal y alteraciones del neurodesarrollo de los niños a largo plazo [4-8].

Los periodos de desarrollo del cerebro durante la vida fetal y en los primeros años de vida son críticos y van a determinar el desarrollo a largo plazo en los diferentes dominios neuropsicológicos tales como cognición, lenguaje, motricidad y conducta. Es indiscutible que uno de los periodos más importantes para la determinación del volumen neuronal, la sinaptogénesis y la arborización dendrítica, es el último trimestre de la gestación [9-11]; por tanto, se considera que diferencias en el ambiente intrauterino en los diferentes tramos de la vida fetal, y particularmente en el último trimestre de la gestación, pueden determinar sustancialmente el neurodesarrollo y el desarrollo cerebral a largo plazo [7, 9, 12, 13].

En los últimos años, numerosos estudios han sugerido que los niños nacidos de madres con diabetes gestacional presentan un retraso en el lenguaje, daños en la memoria de reconocimiento, pobre desarrollo motor y alteraciones neuropsicológicas en las diferentes etapas de la infancia [4, 8, 14-19]. Por otra parte, se ha comprobado que el neurodesarrollo está asociado a la ganancia de peso durante el embarazo y al peso pre-concepcional de la madre, sobre todo en el caso de

existencia de obesidad antes de la concepción [5, 20-22]. Dos revisiones sistemáticas llevadas a cabo recientemente muestran divergencias en los resultados y por tanto, aún no hay datos concluyentes respecto al papel que juega la obesidad, la diabetes y la ganancia de peso durante la gestación sobre el neurodesarrollo; además, la mayoría de los estudios realizados no exploran los efectos del neurodesarrollo antes de los 20 meses de vida [23, 24]. El efecto de la obesidad, sobrepeso y la diabetes sobre el neurodesarrollo en edades tempranas, requiere un mayor conocimiento ya que puede ser un importante predictor de problemas cognitivos y psicológicos en la edad adulta, tales como problemas en las funciones ejecutivas, enfermedades ligadas a trastornos de la conducta, envejecimiento precoz, y coeficientes de inteligencia (IQ) más bajos en adultos [7, 25-27]. Hoy día hay una brecha en los estudios realizados hasta ahora, pues se han considerado los efectos de la diabetes gestacional y la obesidad de forma aislada [23, 24].

El estudio PREOBE es un estudio prospectivo de casos-control, que trata de explorar los efectos de ambas patologías, obesidad y diabetes, cuando están presentes en las mujeres embarazadas sobre el crecimiento y neurodesarrollo de los hijos. En el presente trabajo se investiga la influencia de dichas patologías maternas sobre el neurodesarrollo de los hijos a los 6 y 18 meses de vida.

Material y métodos

DISEÑO DEL ESTUDIO

Las embarazadas participantes en el estudio PREOBE fueron reclutadas entre los años 2007 y 2012 en los Hospitales Universitarios de Granada, "San Cecilio" y el Materno-Infantil (España). En total, 331 mujeres fueron incluidas entre las semanas 12 y 20 de gestación (Figura 1).

Los *criterios de inclusión* en el estudio fueron: mujeres sanas, normopeso, o con presencia de obesidad o sobrepeso pre-gestacional, o que desarrollaran diabetes gestacional, con embarazos simples no complicados y de edades comprendidas entre 18-42 años. Se clasificaron en cuatro grupos según su índice de masa corporal (IMC) o la presencia de diabetes gestacional: Grupo normo-peso (Control) ($18.5 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$; $n=132$); Grupo sobrepeso ($25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{IMC} < 30 \text{ kg/m}^2$; $n=56$); Grupo obesidad ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$; $n=64$), y Grupo de diabéticas gestacionales ($\text{IMC} \geq 18.5 \text{ kg/m}^2$; $n=79$). Las embarazadas diagnosticadas de diabetes gestacional fueron incluidas en este grupo en la semana 34 de gestación.

Los *criterios de exclusión* del estudio fueron: participar simultáneamente en otras investigaciones, tomar cualquier clase de tratamiento farmacológico, enfermedades diagnosticadas distintas de la obesidad, diabetes gestacional o sobrepeso (por ejemplo, diabetes pre-gestacional, hipertensión o preeclampsia, retraso del crecimiento fetal intrauterino, infección materna durante el embarazo, hipo/hipertiroidismo, enfermedades hepáticas y la enfermedades renales) o llevar una dieta extravagante o vegetariana.

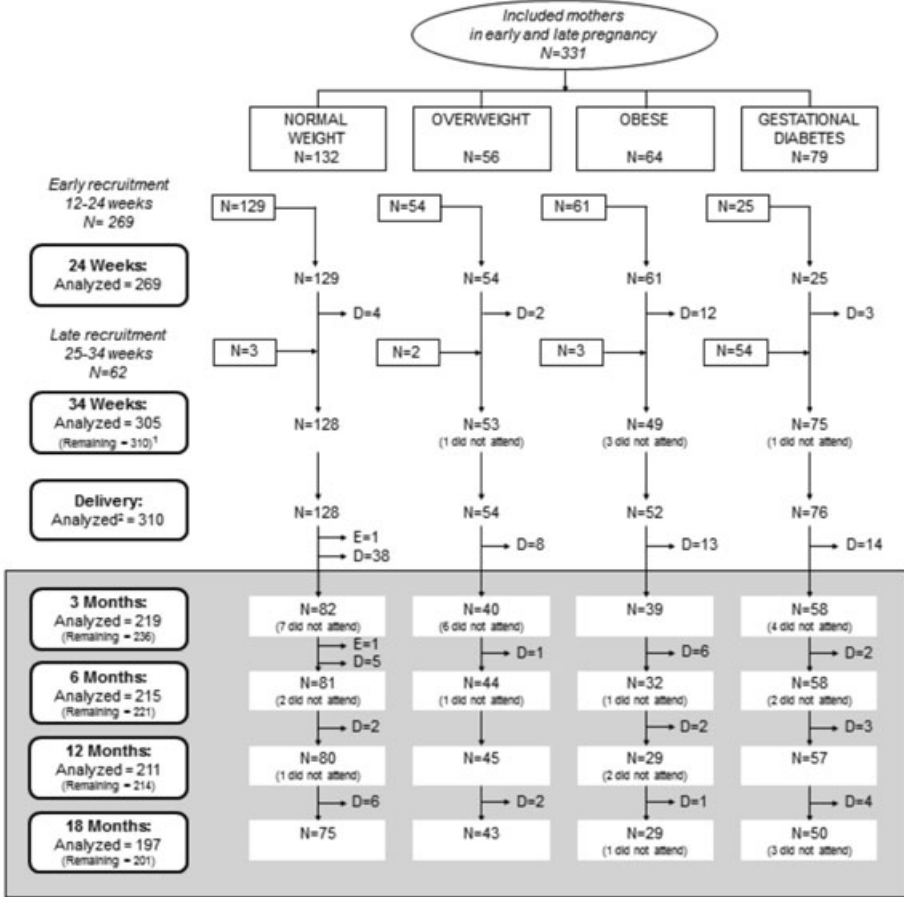


FIGURA 1. Diseño del estudio Preobe.

This figure shows drop outs and number of visits at each stage of the study.

¹ At each visit, domr cases did not attend but remained in the trial for later visits.

D = drop outs and E = exclusions (1 infant al delivery due to congenital heart disease and one before the six months follow up due to severe immunodeficiency).

Del total de las 331 mujeres reclutadas, 265 finalizaron el seguimiento hasta el momento del parto: sanas normo-peso (n=104), sobrepeso (n=48), obesas (n=44) y diabéticas gestacionales (n=69); otros dos casos fueron excluidos después del parto por presentar anomalías congénitas. Las embarazadas que desarrollaron diabetes gestacional fueron remitidas a la Unidad de Endocrinología del Hospital co-

rrespondiente para ser sometidas a control médico de su enfermedad y a un control dietético.

Este estudio fue aprobado por los Comités de Ética de los Hospitales Universitarios de Granada. Todas las madres firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las características generales de las mujeres embarazadas incluidas en el estudio, se recogieron mediante el uso de cuestionarios y registros médicos de la madre, incluyendo edad, peso pre-gestacional, altura e índice de masa corporal (IMC), nivel educativo, paridad, consumo de tabaco y alcohol durante el embarazo, y coeficiente de inteligencia (CI) materno obtenido mediante el Factor G de Cattell. Igualmente, se realizaron registros médicos de los niños respecto al sexo, peso, longitud y perímetro cefálico al nacimiento, puntuación en el test Apgar, edad gestacional y peso de la placenta; a los tres meses de edad, las madres fueron entrevistadas por el pediatra acerca del modo de alimentación del niño (lactancia materna, artificial o mixta) (Tabla 1).

Los niños fueron visitados a los 6 y 18 meses de edad; en estas revisiones se realizó evaluación antropométrica, se completaron cuestionarios de salud y se realizó exploración médica.

EVALUACIÓN DEL NEURODESARROLLO

La evaluación del neurodesarrollo en los niños a los 6 y 18 meses de edad fue llevada a cabo mediante el uso de las escalas Bayley para el desarrollo infantil, tercera edición (BSID-III). El BSID-III obtiene medidas en el neurodesarrollo de los niños en cuatro dominios: desarrollo cognitivo, lenguaje (receptivo y expresivo), desarrollo motor (motricidad fina y gruesa) y desarrollo socio-emocional; tanto en el desarrollo del lenguaje como en el motor se pueden obtener dos medidas compuestas [28, 29]. La evaluación de los niños mediante el BSID-III siempre fue realizada por el mismo psicólogo previamente entrenado. El tiempo aproximado en la duración del test fue de 15-25 minutos a los 6 meses y 30-45 minutos a los 18 meses. Las madres también rellenaron el cuestionario del BSID-III acerca del desarrollo socio-emocional del niño.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevo a cabo utilizando el programa estadístico SPSS (versión 20.0; IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La distribución normal de los datos fue evaluada usando el test de Shapiro-Wilk. La estadística descriptiva se expresa en media y desviación estándar.

TABLA 1. Características generales de las parejas madre-hijo participantes en el Proyecto PREOBE, cuyos niños fueron evaluados a los 6 meses de edad (n=215); se incluye comparación entre los 4 grupos de estudio.

		Grupo control N=81	Sobrepeso N=44	Obesas N=32	Diabetes Gestacional N=58	P
Edad materna (años)		31 (6) _{a,b}	33 (6) _{a,c}	31 (5) _b	34 (5) _c	< 0.001
Nivel educativo	Primaria / Secundaria	42,5% _a	55,8% _{a,b}	84,4% _b	57,9% _a	0.001
	Universidad / Doctor	57,5% _a	44,2% _{a,b}	15,6% _b	42,1% _a	
CI materno (puntos)		111 (15)	103 (17)	108 (15)	104 (20)	0.091
IMC Pre-concepcional (kg/m ²)		22.03±1.66 _a	27.16±1.36 _b	33.14±2.68 _c	27.97±6.63 _b	< 0.001
Ganancia de peso en la gestación (kg)		12,96±5,89 _a	10,30±4,93 _{a,b}	7,93±6,34 _b	7,00±8,55 _{b,c}	< 0.001
Nº de hijos	0	58,8%	53,5%	40,6%	52,6%	0.387
	≥1	41,2%	46,5%	59,4%	47,4%	
Fumadora en el embarazo	No	83,1%	92,7%	90,3%	93,8%	0.235
	Sí	16,9%	7,3%	9,7%	6,2%	
Consumo de alcohol en la gestación	No	95,8%	97,6%	96,8%	93,8%	0.827
	Sí	4,2%	2,4%	3,2%	6,2%	
Peso placentario (g)		482,8±116,8 _a	508,7±123,1 _{a,b}	560,4±135,8 _b	522,3±119,6 _{a,b}	0.037
Peso al nacimiento (g)		3283,5±378,1	3290,0±519,6	3480,6±533,2	3311,2±407,7	0.176
Longitud al nacimiento(cm)		50,51±1,81	50,45±1,72	51,23±2,39	50,14±2,27	0.141
Perímetro craneal al nacimiento (cm)		34,42±1,29	34,50±1,14	34,37±1,79	34,65±1,48	0.807

TABLA 1 (CONT.). Características generales de las parejas madre-hijo participantes en el Proyecto PREOBE, cuyos niños fueron evaluados a los 6 meses de edad (n=215); se incluye comparación entre los 4 grupos de estudio.

		Grupo control N=81	Sobrepeso N=44	Obesas N=32	Diabetes Gestacional N=58	P
Sexo	Niño	49,4% _a	45,5% _a	53,1% _a	55,2% _a	0.782
	Niña	50,6% _a	54,5% _a	46,9% _a	44,8% _a	
Tipo de lactancia	Materna	57,7%	53,8%	35,5%	42,3%	0.212
	Artificial	22,5%	30,8%	48,4%	36,5%	
	Mixta	19,7%	15,4%	16,1%	21,2%	
Edad gestacional (semanas)		40 (1)	39,5 (1)	40 (2)	40 (1)	0.230
Apgar 1 min		9 (0)	9 (0)	9 (0)	9 (0)	0.218
Apgar 5 min		10 (0)	10 (0)	10 (0)	10 (0)	0.748
Ingreso en UCIN	No	93,5%	100,0%	100,0%	100,0%	0.053
	Sí	6,5%	0,0%	0,0%	0,0%	

dar para las variables continuas, mediana y rango intercuartil para las variables no continuas. Para las variables categóricas y las categorizadas (se categorizaron para dejarlas en solo dos valores, cuando el registro de datos tenía más de 5 categorías), han quedado expresadas en frecuencias absolutas y porcentajes.

Debido a la presencia de variables que no presentaron una distribución normal, la comparación de las variables continuas fue llevada a cabo usando el test de suma de rangos no paramétrico de Kruskal-Wallis. El test de Chi-cuadrado fue aplicado a los diferentes grupos en las variables categóricas y las categorizadas. Se hicieron comparaciones de las puntuaciones de neurodesarrollo entre los cuatro grupos de estudio. En el caso de existir diferencias significativas entre los grupos, la corrección de Bonferroni fue usada para identificar las diferencias por pares en los diferentes grupos de estudio. Por otra parte, todas las puntuaciones de neurodesarrollo fueron dicotomizadas usando los percentiles 25, 50 y 75, hallando su ratio de probabilidad (ORs) y tomando valores por debajo y por encima de los percentiles calculados en cada grupo, usando el grupo normo-peso (control) como referencia. Con el fin de determinar los efectos de las variables confusoras obtenidas en las madres y en los niños, cuando en la comparación entre grupos se encontraron diferencias significativas, se realizó una regresión logística bivariada y se aplicó un ajuste por las variables confusoras que resultaron significativas entre los grupos de estudio (método introducir).

Resultados

De las 265 parejas madre-hijo que llegaron al final del embarazo, 215 niños fueron evaluados con el test de Bayley a los 6 meses de edad y 197 a los 18 meses. Para determinar si existían diferencias entre los diferentes grupos de estudio se analizaron sus características generales y las variables confusoras (Tabla 1). Se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio respecto a la edad materna, peso ganado durante el embarazo, peso de la placenta, nivel educativo de la madre y en el índice de masa corporal pre-concepcional. Las variables que presentaban diferencias entre los grupos fueron utilizadas en el modelo de regresión logística, excepto el IMC pre-concepcional, para eliminar la colinealidad.

Para el análisis de los resultados del test de Bayley a los 6 y 18 meses, se ha aplicado el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, realizando las comparaciones entre los cuatro grupos de estudio. A los 6 meses de edad, se observaron diferencias significativas en las puntuaciones compuestas del lenguaje ($P=0.011$) y desarrollo cognitivo ($P=0.023$) y también en la subescala del lenguaje expresivo ($P=0.033$). El análisis post-hoc demostró diferencias significativas en las puntuaciones de estas escalas que resultaron más elevadas en los niños nacidos de madres obesas respecto a los nacidos de las madres control. No se constataron diferencias significativas a los 6 meses de edad en los dominios de desarrollo motor y socio-emocional. A los 18 meses se comprobó que las diferencias halladas a los 6 meses habían desaparecido; en su lugar, se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la motricidad gruesa. Al comparar los grupos mediante la corrección de Bonferroni estas diferencias desaparecían, excepto por una tendencia a puntuaciones más bajas en los hijos de madre diabética respecto al control (corrección de Bonferroni $p=0.070$; sin corrección $p=0.020$).

Todas las subescalas del test de Bayley se dicotomizaron utilizando los valores por encima y por debajo de los percentiles 25, 50 y 75. Se calcularon los valores de ORs utilizando para ello una regresión logística, y considerando las madres sanas normo-peso del grupo control como grupo de referencia. Se obtuvieron las ORs ajustadas por las variables confusoras (edad materna, peso de la placenta, educación materna y peso ganado durante el embarazo) y por el grupo, y las ORs no ajustadas tal y como aparecen en las Tablas 2 y 3.

A los 6 meses de edad, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio en el desarrollo motor y desarrollo socio-emocional; sin embargo, los niños nacidos de madres obesas tienen un incremento significativo de la probabilidad de obtener altas puntuaciones en Cognitivo Compuesta y en dos puntuaciones del Lenguaje (Receptiva y Compuesta). El modelo de regresión logística no ajustado revela una mayor probabilidad en el grupo niños nacidos de madres obesas de tener una puntuación en el dominio Cognitivo Compuesto más alta respecto a los niños nacidos de madres sanas normo-peso (control), por encima del percentil 25 (OR: 3.1; 95% CI:1.2–7.6; $p=0.016$), del percentil 50 (OR: 2.9;

TABLA 2. Modelo de regresión logística analizando las odds de tener diferentes puntuaciones en la escala de Bayley a los 6 meses.

PUNTUACIONES	Sobrepeso vs. Control				Obesidad vs. Control				Diabetes Gestacional vs. Control			
	No ajustado (n=215)	OR (95% CI)	P	Ajustado (n=156) ¹	No ajustado (n=215)	OR (95% CI)	P	Ajustado (n=156) ¹	No ajustado (n=215)	OR (95% CI)	P	Ajustado (n=156) ¹
Cognitiva	1.385			1.543	2.923			2.310	1.314			1.407
Compuesta > P50 ²	(0.649 - 2.955)	0.400	(0.628 - 3.793)	0.344	(1.258 - 6.793)	0.013*	(0.777 - 6.866)	0.132	(0.653 - 2.647)	0.444	(0.533 - 3.715)	0.491
Lenguaje	2.038			1.674	2.366			1.620	1.893			1.543
Receptivo > P50	(0.942-4.410)	0.071	(0.665-4.212)	0.274	(1.012 - 5.534)	0.047*	(0.536-4.900)	0.393	(0.925-3.874)	0.081	(0.571-4.169)	0.393
Lenguaje Expresivo	1.593			1.919	2.126			2.635	0.826			0.680
> P50	(0.761-3.336)	0.217	(0.780-4.722)	0.156	(0.924-4.891)	0.076	(0.866-8.016)	0.088	(0.412-1.654)	0.589	(0.246-1.883)	0.458
Lenguaje	2.375			2.756	2.692			3.297	1.676			1.786
Compuesta > P50	(1.111 -5.075)	0.026*	(1.099 -6.910)	0.031*	(1.159 -6.249)	0.021*	(1.087 -10.003)	0.035*	(0.826 -3.401)	0.152	(0.658 -4.848)	0.255
Motricidad Fina	1.077			1.233	1.385			2.029	0.875			0.762
> P50	(0.517-2.244)	0.843	(0.509-2.986)	0.643	(0.608-3.154)	0.438	(0.677-6.080)	0.207	(0.445-1.721)	0.699	(0.292-1.986)	0.577
Motricidad Gruesa	1.262			1.572	1.075			1.160	1.382			1.364
> P50	(0.603-2.640)	0.536	(0.643-3.843)	0.321	(0.471-2.456)	0.863	(0.392-3.434)	0.789	(0.702-2.723)	0.349	(0.519-3.583)	0.529
Motricidad	0.910			1.058	1.160			1.137	0.864			0.701
Compuesta > P50	(0.432-1.916)	0.804	(0.427-2.625)	0.903	(0.510-2.638)	0.724	(0.380-3.400)	0.818	(0.435-1.714)	0.675	(0.256-1.921)	0.490
Socio-emocional	1.151			1.530	0.635			0.706	1.158			1.348
Compuesta > P50	(0.543-2.441)	0.714	(0.625-3.747)	0.352	(0.261-1.546)	0.317	(0.225-2.213)	0.550	(0.563-2.382)	0.691	(0.510-3.565)	0.547

Las odds ratio (ORs) se presentan para niños nacidos de madre con sobrepeso, obesidad y diabetes gestacional, frente al grupo control.
1 Modelo de regresión logística ajustado para edad maternal, nivel educativo de la madre, peso placentario y ganancia de peso durante la gestación.
2 ORs para un valor de la escala de Bayley por encima de la mediana. * p< 0.05.

TABLA 3. Modelo de regresión logística analizando las odds de tener diferentes puntuaciones en la escala de Bayley a los 18 meses.

PUNTUACIONES	Sobrepeso vs. Control				Obesidad vs. Control				Diabetes Gestacional vs. Control			
	No ajustado (n=197)		Ajustado (n=147) ¹		No ajustado (n=197)		Ajustado (n=147) ¹		No ajustado (n=197)		Ajustado (n=147) ¹	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Cognitivo	2.231		2.457		1.086		0.978		1.919		2.337	
Compuesta > P50 ²	(0.986-5.045)	0.054	(0.914-6.606)	0.075	(0.396-2.974)	0.873	(0.242-3.957)	0.976	(0.870-4.233)	0.106	(0.773-7.068)	0.133
Lenguaje	0.648		0.669		0.393		0.460		0.532		0.518	
Receptivo > P50	(0.281-1.492)	0.308	(0.251-1.785)	0.422	(0.134-1.150)	0.088	(0.121-1.747)	0.254	(0.234-1.208)	0.131	(0.167-1.611)	0.256
Lenguaje Expresivo	0.571		0.626		0.848		0.678		0.359		0.634	
> P50	(0.243-1.339)	0.198	(0.222-1.766)	0.376	(0.338-2.127)	0.725	(0.190-2.414)	0.549	(0.147-0.877)	0.025*	(0.198-2.030)	0.443
Lenguaje	0.904		1.145		0.480		0.335		0.442		0.663	
Compuesta > P50	(0.426-1.919)	0.792	(0.472-2.781)	0.764	(0.200-1.155)	0.101	(0.104-1.080)	0.067	(0.212-0.922)	0.030*	(0.244-1.796)	0.418
Motricidad Fina	1.162		1.414		0.936		1.034		1.185		1.056	
> P50	(0.537-2.516)	0.702	(0.556-3.598)	0.467	(0.381-2.300)	0.885	(0.313-3.416)	0.956	(0.567-2.475)	0.651	(0.367-3.040)	0.919
Motricidad	0.566		0.540		0.354		0.333		0.405		0.638	
Gruesa > P50	(0.265-1.208)	0.141	(0.217-1.344)	0.185	(0.142-0.878)	0.025*	(0.104-1.063)	0.063	(0.193-0.850)	0.017*	(0.232-1.756)	0.385
Motricidad	0.739		0.678		0.628		0.351		0.744		0.694	
Compuesta > P50	(0.347-1.575)	0.434	(0.271-1.693)	0.405	(0.261-1.507)	0.297	(0.107-1.157)	0.085	(0.362-1.530)	0.421	(0.251-1.919)	0.481
Socio-emocional	1.151		1.002		0.635		0.974		1.158		1.641	
Compuesta > P50	(0.543-2.440)	0.714	(0.409-2.457)	0.996	(0.261-1.546)	0.317	(0.327-2.901)	0.962	(0.563-2.382)	0.691	(0.607-4.438)	0.329

Las odds ratio (ORs) se presentan para niños nacidos de madre con sobrepeso, obesidad y diabetes gestacional, frente al grupo control.

1. Modelo de regresión logística ajustado para edad materna, nivel educativo de la madre, peso placentario y ganancia de peso durante la gestación.

2. ORs para un valor de la escala de Bayley por encima de la mediana. * p < 0.05.

95% IC:1.3–6.8; $p=0.013$), y en el percentil 75 (OR:3.5; 95% IC:1.1–11.4; $p=0.038$). Resultados similares se observaron respecto al Lenguaje Compuesto, pues los hijos de madres obesas tienen más probabilidad de tener más altas puntuaciones en Lenguaje Compuesto, por encima del percentil 25 (OR:5.7; 95% IC:1.6–20.3; $p=0.007$) y por encima del percentil 50 (OR: 2.7; 95% IC:1.2-6-2; $p=0.021$). Efectos positivos similares se vieron en el lenguaje receptivo (percentil 50 y 75). El modelo sin ajustar también mostró en el grupo de niños nacidos de madres con sobrepeso una mayor probabilidad de tener una puntuación en lenguaje compuesto por encima del percentil 50 (OR:2.4; 95% IC:1.1– 5.1; $p=0.026$), y por encima del percentil 25 (OR:2.3; 95% IC:1.0–4.9; $p=0.041$), comparados con el grupo control. Tras el ajuste por las variables confusoras, los efectos significativos desaparecieron, excepto para la puntuación de Lenguaje Compuesto donde la probabilidad de los niños nacidos de madres obesas y con sobrepeso de tener una mayor puntuación significativamente más alta respecto a la de los niños del grupo control; los hijos de madres obesas mostraron más posibilidades de tener una puntuación por encima del percentil 25 en lenguaje compuesta (ORajustada:4.9; 95% CI:1.2-20.3; $p=0.030$) y del percentil 50 (ORajustada:3.3; 95% IC:1.1-10.0; $p=0.035$). En resumen, el modelo de regresión logística por el método enter sugiere que la probabilidad de que los hijos de madres obesas y con sobrepeso muestren puntuaciones más altas en las escalas cognitivas y de lenguaje del Bayley es significativamente mayor (2.8-11.3) respecto a los niños nacidos de madres normopeso del grupo control.

A los 18 meses, el análisis de regresión sin ajustar mostró una probabilidad mayor de que los hijos de madres diabéticas presenten puntuaciones más bajas en lenguaje expresivo, lenguaje compuesto y motricidad gruesa. Estas diferencias en los hijos de madre diabética desaparecieron tras realizar el ajuste por las variables confusoras. Los nacidos de madres obesas también mostraron una mayor probabilidad de tener puntuaciones en motricidad gruesa menores del percentil 50. Estas diferencias se mantuvieron tras el ajuste por las variables confusoras, y los hijos de madres obesas presentaron una mayor probabilidad de encontrarse por debajo del percentil 25 en motricidad gruesa (ORajustada:0.2; 95% CI:0.1-0.7; $p=0.011$) y en motricidad compuesta (ORajustada:0.3; 95% IC:0.1-0.9; $p=0.026$) (Tabla 3). El modelo ajustado sugiere un mayor riesgo para los hijos de madres con sobrepeso de obtener una puntuación en motricidad gruesa y desarrollo socio-emocional por debajo del percentil 25 (ORajustada:0.3, 95% IC:0.1-0.8; $p=0.022$; ORajustada:0.4; 95% IC:0.1 – 0.9; $p=0.034$, respectivamente).

Se estudió igualmente la tasa de cambio en las puntuaciones obtenidas con el Bayley III entre los 6 y los 18 meses de edad calculados para cada variable (18 meses - 6 meses) (Tabla 4). No se comprobaron diferencias significativas en la tasa de cambio entre los grupos, excepto en las puntuaciones del Lenguaje Compuesto donde la tasa de cambio fue significativamente inferior en los hijos de madres obesas (-6 puntos) frente a los niños nacidos de madres sanas normo-peso (+1.5 puntos) (corrección por Bonferroni $p=0.021$).

TABLE 4. Diferencia¹ en las puntuaciones de Bayley III entre 6 y 18 meses de edad en los cuatro PREOBE-grupos.

	Normopeso N=74	Sobrepeso N=42	Obesa N=28	Diabetes Gestacional N=48	p ²
Scaled Cognitive Score ³	2,00 (3)	3,00 (3,25)	2,00 (2)	2,00 (3,75)	0.436
Cognitive Composite Score	10,00 (15)	15,00 (16,25)	10,00 (10)	10,00 (18,75)	0.431
Scaled Receptive Language Score	0,00 (4)	-1,00 (3)	-1,00 (3,75)	0,00 (3)	0.168
Scaled Expressive Language Score	0,50 (4)	0,00 (3)	-0,50 (3,75)	0,00 (2)	0.128
Language Composite Score	1,50 _a (18,75)	-3,00 _{a,b} (12,75)	-6,00 _b (20,25)	-3,00 _{a,b} (11,25)	0.019
Scaled Fine Motor Score	0,00 (4)	1,00 (4,25)	0,00 (3)	0,5 (3)	0.525
Scaled Gross Motor Score	4,00 (4)	3,00 (4)	2,00 (4,50)	2,00 (3,75)	0.136
Motor Composite Score	11,00 (23)	10,50 (21)	7,50 (20,75)	9,00 (17,75)	0.676
Scaled Social-Emotional Score	0,00 (5)	0,00 (6)	1,00 (4,75)	0,0 (4)	0.909
Social-Emotional Composite Score	0,00 (25)	0,00 (30)	5,00 (23,75)	0,0 (20)	0.917

Datos expresados en media $\pm$ SD

1. Se calculó la diferencia en bruto como el cambio en la puntuación de 6 a 18 meses.
2. P-valores de las diferencias globales entre los grupos de PREOBE usando ANOVA. Los que valores no comparten el mismo sufijo (abc) fueron significativamente diferentes en la prueba post hoc de Bonferroni.

Discusión

El presente estudio analiza el efecto del sobrepeso y obesidad materna, así como de la diabetes gestacional en la madre sobre el neurodesarrollo de sus hijos. Este diseño de estudio ha permitido explorar los efectos de la obesidad y el sobrepeso sobre el neurodesarrollo de forma separada a los efectos de la diabetes gestacional. Nuestro principal y sorprendente hallazgo ha sido el que los niños nacidos de

madres con obesidad obtienen puntuaciones más altas en desarrollo cognitivo y del lenguaje a los 6 meses de edad. Esta diferencia se mantiene tanto cuando se analizan los datos como variables continuas o categóricas, a pesar de que nuestros números absolutos fueron bajos; además, el efecto se mantuvo para el desarrollo del lenguaje incluso tras ajustar el resultado por posibles variables confusoras que pudieran afectarle. A los 18 meses, los hijos de madres con obesidad redujeron sus puntuaciones significativamente comparadas con las del grupo de niños nacidos de madres sanas normo-peso (control), y los valores absolutos fueron similares; en cambio hubo una menor diferencia entre los grupos en las puntuaciones de motricidad gruesa, esta vez a favor de los nacidos en el grupo control, en comparación a los otros tres grupos de estudio.

Tras el aumento de investigaciones relacionadas con la obesidad como problema de máximo interés para la salud pública, se han publicado numerosos estudios acerca de la asociación entre el neurodesarrollo del niño y la obesidad materna y diabetes gestacional. Estos resultados son divergentes y la población examinada varía respecto a los datos que se presentan en este trabajo, pues no aparece en la literatura ningún trabajo que distinga entre los grupos de obesidad, sobrepeso y diabetes gestacional. La mayoría de los estudios publicados sobre el efecto de la obesidad materna y el sobrepeso, informan de un retraso en el neurodesarrollo [5, 30-32]. Neggers mostró en un estudio realizado en niños procedentes de familias afroamericanas ($n=355$, media de edad 5.3 años), un modelo de ajuste covariado, que la obesidad en las madres predice un bajo IQ en el niño y puntuaciones no verbales bajas comparado con madres normo-peso [5]. De forma similar, Heikura et al., en una cohorte de $n>21000$ niños de 11.5 años y de los que se obtuvo el CI, identifican la obesidad materna y los factores socioeconómicos como los de mayor riesgo de discapacidad mental [30]; Tanda et al., encontraron efectos similares en las puntuaciones cognitivas [31]. En el mayor análisis por número de casos estudiados, Huang et al., evaluaron retrospectivamente 30000 parejas madre-hijo procedentes de Estados Unidos, y pasaron el test de inteligencia WISC a todos los niños a los 7 años; después de ajustar por los numerosos factores principales que pudieran incidir en los resultados, demostraron una asociación en forma de U entre el peso pre-concepcional y el CI del niño [32].

En dos recientes artículos de revisión Van Lieshout et al., han descrito un total de 23 ensayos que evalúan esta cuestión en diferentes edades y poblaciones, concluyendo que los hijos de madres obesas y con sobrepeso tienen un incremento del riesgo de alteraciones del desarrollo cognitivo y aumento de problemas de atención, aunque advierten que faltan datos para confirmar una clara evidencia científica, por lo que hacen notar la necesidad de más investigaciones para demostrar la causalidad [23, 24]. Por su parte, Brion et al., llegan a una conclusión diferente, afirmando que existe una asociación entre la obesidad materna y alteraciones del neurodesarrollo, aunque esta relación es confusa debido a los efectos de factores sociodemográficos [20]. Los presentes hallazgos a

los 6 meses de vida han sido sorprendentes y destacan en completo contraste con la literatura revisada anteriormente. Ningún estudio anterior ha informado de un incremento en las puntuaciones en ninguna de las evaluaciones de hijos nacidos de madres con obesidad y sobrepeso. Sin embargo, ninguno de los anteriores artículos evaluó a los niños en esta edad y los resultados pueden ser debidos a un aumento precoz en las habilidades de desarrollo neurológico en el subgrupo de hijos de madres obesas. Sin embargo, la dramática caída en las puntuaciones del desarrollo neurológico observado en el grupo de hijos de obesas entre los 6 y 18 meses sugiere que el aumento de las puntuaciones observadas es temporal y van seguidas de una ralentización que conduce a las puntuaciones del percentil 50, pero que también podría significar el inicio de un deterioro posterior. Por otra parte, podría cuestionarse si este aumento precoz y temporal estaría indicando un perfil de neurodesarrollo distinto que a largo plazo no es favorable. Solo podemos especular sobre los mecanismos que conducen a este incremento temporal; podría ser debido a un incremento del paso de nutrientes a través de la placenta en la gestación de madres obesas produciendo un rápido crecimiento sinaptogénico a nivel cerebral al final de la gestación y durante los primeros meses de vida, pero sin estabilidad sostenida. Otra posible explicación estaría relacionada con una interacción con la inflamación materna asociada a la obesidad, el estado del hierro o de ácidos grasos esenciales. Sin embargo, para establecer un mecanismo de este tipo se requieren más estudios y muestras de mayor tamaño.

Nuestros resultados a los 18 meses son menos sorprendentes, al no demostrarse diferencias significativas entre los hijos de madres obesas y con sobrepeso, respecto a los niños nacidos de mujeres sanas normo-peso, excepto la presencia de una tendencia a puntuaciones más bajas en desarrollo de la motricidad gruesa. Los análisis realizados dividiendo las variables neuropsicológicas por encima y por debajo de la mediana (percentil 50), revelan un incremento del riesgo de obtener puntuaciones más bajas en desarrollo psicomotor tanto en los hijos de obesas como de madres con sobrepeso y bajas puntuaciones en desarrollo socio-emocional en niños nacidos de madres con sobrepeso. Debido a la baja potencia de los resultados y el hecho de que la mayoría de los efectos negativos asociados al sobrepeso y obesidad se han observado más tardíamente (18 meses), estos datos deben ser interpretados con cautela.

Otros estudios realizados en lactantes nacidos de madres obesas y con sobrepeso, sugieren un efecto negativo de la obesidad materna y del sobrepeso sobre las puntuaciones de desarrollo cognitivo pero no sobre las puntuaciones de desarrollo motor [21, 33]. Hinkle et al. demostraron en hijos de madres obesas, una reducción de 2-3 puntos en el desarrollo mental [Bayley II] a los dos años de edad, incluso tras ajustar por diversas variables confusoras [33]. Casas et al., estudiando 2000 parejas madre-hijo, comprobaron la existencia de una asociación significativa entre el IMC materno y bajas puntuaciones a nivel cognitivo en los niños a los

11-22 meses de edad. La obesidad se asoció con un descenso de las puntuaciones del desarrollo cognitivo (Bayley) de -2.7 y -3.7 puntos respectivamente [21]. Sin embargo, ninguna de estas evaluaciones se hizo por debajo de los dos años de edad como ocurre con los datos del presente estudio.

Los efectos de la diabetes materna sobre el neurodesarrollo de los niños han sido objeto de repetidos estudios en los últimos años. La literatura previa, sugiere una relación negativa entre la presencia de diabetes materna y el neurodesarrollo de sus hijos [4, 15-17]. En un estudio de casos-control, Dionne et al., compararon hijos de madre diabética (n=221) y niños control (n=2612) en relación al desarrollo del lenguaje desde los 18 meses hasta los 7 años de edad en dos cohortes canadienses; encontraron que los niños nacidos de madres diabéticas tenían puntuaciones significativamente más bajas en lenguaje expresivo en varios puntos temporales incluyendo los 18 meses de edad [17]; los efectos negativos también se encontraron sobre las puntuaciones cognitivas totales [15].

A los 18 meses de seguimiento, los niños del presente estudio nacidos de madres con diabetes gestacional tenían puntuaciones más bajas en motricidad gruesa, lenguaje expresivo y lenguaje compuesto. Estos resultados están en concordancia con la literatura revisada, a pesar de que estos efectos no se confirman tras realizar el ajuste por las variables confusoras. Esto podría justificarse por la falta de potencia en la muestra, pero también podría deberse a la edad de evaluación, pues los efectos significativos de la diabetes sobre el neurodesarrollo se han encontrado más allá de los 18 meses de edad.

Actualmente, a los 6 meses de edad las puntuaciones a nivel cognitivo y de lenguaje fueron bastante más altas comparadas con el grupo control, y similares a las encontradas en el grupo de hijos de madres obesas. Se podría especular un efecto temporal tal y como se ha discutido anteriormente para los hijos de mujeres obesas, pues en la gestación diabética también se ha comprobado un incremento acentuado del paso de nutrientes energéticos desde la madre al feto. Por otra parte, en este análisis, no se ha tenido en cuenta el IMC de las madres con diabetes gestacional, estando incluidas en este grupo mujeres con normo-peso, con sobrepeso y con obesidad que fueron diagnosticadas de diabetes gestacional. Estos subgrupos pueden afectar a las diferencias observadas en el neurodesarrollo de sus hijos; tras la subclasificación de este grupo no se pudieron comprobar diferencias significativas en el neurodesarrollo de los niños, debido al bajo número de casos en alguno de los subgrupos.

Una limitación de este estudio es el número de casos obtenidos en el grupo de madres obesas. La dificultad añadida al seguimiento a largo plazo de los niños desde la gestación de sus madres, es precisamente la existencia de obesidad materna, habiéndose encontrado una tasa mayor de abandono en este grupo. Otra limitación del presente estudio es que solo se han evaluado los niños mediante las puntuaciones obtenidas con el test de Bayley III. Otros estudios previos han informado de los efectos negativos de la obesidad materna y de la diabetes ges-

tacional sobre el desarrollo de problemas afectivos y emocionales, trastorno de déficit y atención e hiperactividad (TDAH) y anorexia nerviosa [22, 34-36]. Se han programado nuevas revisiones de los niños participantes en el estudio PREOBE, donde se evaluarán tanto el desarrollo neuropsicológico como la función y estructura cerebral.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio confirman que los recién nacidos de madres con patologías metabólicas durante la gestación, difieren en el perfil de neurodesarrollo. A los 18 meses hay una tendencia a reducir las puntuaciones en varios dominios. Sin embargo, los hallazgos más importantes han sido el incremento temporal en el desarrollo del dominio cognitivo y del lenguaje observado a los 6 meses en los hijos de madres obesas. Estos nuevos hallazgos sugieren de forma contundente la necesidad de realizar más estudios que expliquen los mecanismos implicados en estos hechos.

Agradecimientos y financiación

Un agradecimiento para todo el equipo implicado en el Proyecto PREOBE, por su tenacidad y afán de hacer un buen trabajo. Un agradecimiento muy especial para todas las madres y padres de los niños participantes en el proyecto PREOBE que año tras año están confiando en nosotros y ofreciéndonos también su tiempo y esfuerzo para completar todos las tareas que les proponemos, y siempre con una actitud muy positiva. Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía, convocatoria de Proyectos de Excelencia (P06-CTS-02341) y por el Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. Ref. BFU2012-40254-C03-01.

Bibliografía

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011;377(9765):557-67. Epub 2011/02/08.
2. Global Database On Body Mass Index [database on the Internet]. 2011. Available from: <http://apps.who.int/bmi/index.jsp>.
3. Herring SJ, Oken E, Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Stuebe AM, Kleinman KP, et al. Weight gain in pregnancy and risk of maternal hyperglycemia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2009;201(1):61 e1-7. Epub 2009/04/18.
4. Sesma HW, Georgieff MK. The effect of adverse intrauterine and newborn environments on cognitive development: the experiences of premature delivery and diabetes during pregnancy. *Development and psychopathology*. 2003;15(4):991-1015. Epub 2004/02/27.

5. Neggers YH, Goldenberg RL, Ramey SL, Cliver SP. Maternal prepregnancy body mass index and psychomotor development in children. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 2003;82(3):235-40. Epub 2003/04/16.
6. Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2010;299(3):R711-22. Epub 2010/07/16.
7. Tomalski P, Johnson MH. The effects of early adversity on the adult and developing brain. *Current opinion in psychiatry*. 2010;23(3):233-8. Epub 2010/03/24.
8. Deregnier RA, Nelson CA, Thomas KM, Wewerka S, Georgieff MK. Neurophysiologic evaluation of auditory recognition memory in healthy newborn infants and infants of diabetic mothers. *The Journal of pediatrics*. 2000;137(6):777-84. Epub 2000/12/13.
9. Cusick SE, Georgieff MK. Nutrient supplementation and neurodevelopment: timing is the key. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2012;166(5):481-2. Epub 2012/05/09.
10. Aylward GP. Neurodevelopmental outcomes of infants born prematurely. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*. 2014;35(6):394-407. Epub 2014/07/10.
11. Jacobs R, Harvey AS, Anderson V. Executive function following focal frontal lobe lesions: impact of timing of lesion on outcome. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*. 2007;43(6):792-805. Epub 2007/08/23.
12. Hadders-Algra M. Prenatal and early postnatal supplementation with long-chain polyunsaturated fatty acids: neurodevelopmental considerations. *The American journal of clinical nutrition*. 2011;94(6 Suppl):1874S-9S. Epub 2011/04/29.
13. Georgieff MK. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(2):614S-20S. Epub 2007/02/08.
14. Clausen TD, Mortensen EL, Schmidt L, Mathiesen ER, Hansen T, Jensen DM, et al. Cognitive function in adult offspring of women with gestational diabetes--the role of glucose and other factors. *PLoS One*. 2013;8(6):e67107. Epub 2013/07/11.
15. Fraser A, Nelson SM, Macdonald-Wallis C, Lawlor DA. Associations of existing diabetes, gestational diabetes, and glycosuria with offspring IQ and educational attainment: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Experimental diabetes research*. 2012;2012:963735. Epub 2012/08/29.
16. DeBoer T, Wewerka S, Bauer PJ, Georgieff MK, Nelson CA. Explicit memory performance in infants of diabetic mothers at 1 year of age. *Developmental medicine and child neurology*. 2005;47(8):525-31. Epub 2005/08/20.
17. Dionne G, Boivin M, Seguin JR, Perusse D, Tremblay RE. Gestational diabetes hinders language development in offspring. *Pediatrics*. 2008;122(5):e1073-9. Epub 2008/11/04.
18. Nielsen GL, Andersen E, Lundbye-Christensen S. Maternal blood glucose in diabetic pregnancies and cognitive performance in offspring in young adulthood: a Danish cohort study. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2010;27(7):786-90. Epub 2010/07/20.
19. Ornoy A, Ratzon N, Greenbaum C, Wolf A, Dulitzky M. School-age children born to diabetic mothers and to mothers with gestational diabetes exhibit a high rate of

- inattention and fine and gross motor impairment. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism* : JPEM. 2001;14 Suppl 1:681-9. Epub 2001/06/08.
20. Brion MJ, Zeegers M, Jaddoe V, Verhulst F, Tiemeier H, Lawlor DA, et al. Intrauterine effects of maternal prepregnancy overweight on child cognition and behavior in 2 cohorts. *Pediatrics*. 2011;127(1):e202-11. Epub 2010/12/29.
 21. Casas M, Chatzi L, Carsin AE, Amiano P, Guxens M, Kogevinas M, et al. Maternal pre-pregnancy overweight and obesity, and child neuropsychological development: two Southern European birth cohort studies. *International journal of epidemiology*. 2013;42(2):506-17. Epub 2013/04/10.
 22. Rodriguez A. Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. *J Child Psychol Psychiatry*. 2010;51(2):134-43. Epub 2009/08/14.
 23. Van Lieshout RJ. Role of maternal adiposity prior to and during pregnancy in cognitive and psychiatric problems in offspring. *Nutrition reviews*. 2013;71 Suppl 1:S95-101. Epub 2013/10/30.
 24. Van Lieshout RJ, Taylor VH, Boyle MH. Pre-pregnancy and pregnancy obesity and neurodevelopmental outcomes in offspring: a systematic review. *Obes Rev*. 2011;12(5):e548-59. Epub 2011/03/19.
 25. Langie SA, Lara J, Mathers JC. Early determinants of the ageing trajectory. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2012;26(5):613-26. Epub 2012/09/18.
 26. Braun K. [Synaptic reorganization in early childhood experience and learning processes: relevance for the development of psychological diseases]. *Zeitschrift für klinische Psychologie, Psychiatrie und Psychotherapie / im Auftrag der Gorres-Gesellschaft*. 1996;44(3):253-66. Epub 1996/01/01. Synaptische Reorganisation bei frühkindlichen Erfahrungs- und Lernprozessen: Relevanz für die Entstehung psychischer Erkrankungen.
 27. Laucht M, Esser G, Schmidt MH, Ihle W, Löffler W, Stohr RM, et al. [„Risk children“: the importance of biological and psychosocial risks for child development in the first two years of life]. *Praxis der Kinderpsychologie und Kinderpsychiatrie*. 1992;41(8):274-85. Epub 1992/10/01. „Risikokinder“: Zur Bedeutung biologischer und psychosozialer Risiken für die kindliche Entwicklung in den beiden ersten Lebensjahren.
 28. Albers CA, Grieve AJ. Bayley scales of infant and toddler development, third edition. *Journal of Psychoeducational Assessment*. 2007;25(2):180-90.
 29. Bayley N, editor. Bayley Scales of infant and toddler Development-Third Edition. San Antonio: TX:Harcourt Assessment; 2006.
 30. Heikura U, Taanila A, Hartikainen AL, Olsen P, Linna SL, von Wendt L, et al. Variations in prenatal sociodemographic factors associated with intellectual disability: a study of the 20-year interval between two birth cohorts in northern Finland. *American journal of epidemiology*. 2008;167(2):169-77. Epub 2007/11/21.
 31. Tanda R, Salsberry PJ, Reagan PB, Fang MZ. The impact of prepregnancy obesity on children's cognitive test scores. *Maternal and child health journal*. 2013;17(2):222-9. Epub 2012/02/22.

32. Huang L, Yu X, Keim S, Li L, Zhang L, Zhang J. Maternal prepregnancy obesity and child neurodevelopment in the Collaborative Perinatal Project. *International journal of epidemiology*. 2014;43(3):783-92. Epub 2014/02/27.
33. Hinkle SN, Schieve LA, Stein AD, Swan DW, Ramakrishnan U, Sharma AJ. Associations between maternal prepregnancy body mass index and child neurodevelopment at 2 years of age. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(10):1312-9. Epub 2012/09/12.
34. Robinson M, Zubrick SR, Pennell CE, Van Lieshout RJ, Jacoby P, Beilin LJ, et al. Pre-pregnancy maternal overweight and obesity increase the risk for affective disorders in offspring. *Journal of developmental origins of health and disease*. 2013;4(1):42-8.
35. Van Lieshout RJ, Schmidt LA, Robinson M, Niccols A, Boyle MH. Maternal pre-pregnancy body mass index and offspring temperament and behavior at 1 and 2 years of age. *Child psychiatry and human development*. 2013;44(3):382-90. Epub 2012/09/18.
36. Favaro A, Tenconi E, Santonastaso P. Perinatal factors and the risk of developing anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Archives of general psychiatry*. 2006;63(1):82-8. Epub 2006/01/04.



El polimorfismo materno PPARG Pro12Ala se asocia con el desarrollo neurológico del bebé a los 18 meses de edad

**Torres-Espínola FJ, Altmäe S, Segura M^aT,
Jerez A, Anjos T, Chisaguano M,
López-Sabater M^aC, Entrala V, Alvarez JC,
Agil A, Florido J, Catena A, Pérez-García M,
Campoy C**

Resumen

El PPARG es una de las formas de los receptores activados de proliferación de los peroxisomas (PPARs), implicado en la regulación de la inflamación del sistema nervioso central (neuroprotección) y en el rendimiento cognitivo. Se han identificado diferentes variaciones genéticas del PPARG; el polimorfismo PPARG2 Pro12Ala (rs1801282) es uno de los más estudiados, habiéndose asociado a un aumento del índice de masa corporal (IMC) (obesidad), diabetes Mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, cáncer de mama, deterioro cognitivo y enfermedades neurodegenerativas.

Los objetivos del presente estudio son: 1) Determinar la influencia del polimorfismo Pro12Ala sobre la concentración de ácidos grasos en sangre y en tejido placentario. 2) Examinar la posible relación del polimorfismo PPARG Pro12Ala en mujeres embarazadas con el neurodesarrollo de sus hijos durante los primeros 18 meses de vida.

Un total de 138 parejas madre-hijo participantes en el estudio PREOBE fueron genotipadas para el polimorfismo PPARG Pro12Ala. Se obtuvieron muestras de sangre materna, de cordón umbilical y de tejido placentario en el momento del parto; en dichas muestras se determinaron las concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL). Los bebés fueron evaluados neuropsicológicamente a los 6 y 18 meses de edad mediante el test Bayley III.

Las variantes del Pro12Ala no parecen afectar a las concentraciones de AGPI-CL en los fosfolípidos del plasma materno ni en cordón umbilical, ni tampoco las modifican en el tejido placentario. Se ha podido comprobar un efecto del Pro12Ala sobre el neurodesarrollo de los niños a los 18 meses de edad; los niños cuyas madres tenían el genotipo natural Pro12 mostraron un mejor desarrollo cognitivo (OR = 5.11, 95% CI: 1.379-18.96, $p = 0.015$), del lenguaje (OR = 3.41, 95% CI: 1.35-11.24, $p = 0.044$), y motor (OR = 4.77, 95% CI: 1.243-18.33, $p = 0.023$) respecto a las portadoras del

alelo Ala. Por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio indican un mejor neurodesarrollo a los 18 meses de edad en los niños nacidos de madres con el genotipo Pro12 respecto a aquellos que nacieron de madres portadoras del alelo Ala; esto sugiere efectos a largo plazo de las variantes del PPAR γ implicados en el metabolismo y transporte placentario de nutrientes sobre el desarrollo del cerebro fetal.

Palabras clave: *Programación temprana, PPAR γ , polimorfismo PPAR γ Pro12Ala, neurodesarrollo.*

Introducción

Los receptores activados de proliferación de los peroxisomas (PPARs) son factores de transcripción con funciones cruciales en la homeóstasis de los lípidos, el metabolismo de la glucosa, los procesos anti-inflamatorios y el desarrollo placentario [1, 2]. Hasta la fecha, tres isótopos, PPAR α , PPAR β /d, y PPAR γ , se han identificado en muchas especies, incluyendo seres humanos y roedores [3].

Los PPAR han sido ampliamente estudiados sobre todo, centrándose en los lípidos y el metabolismo de la glucosa, sin embargo según los estudios llevados a cabo en los últimos años están encontrando una implicación en funciones cognitivas y enfermedades neurodegenerativas [4-8]. Los PPARs se encuentran expresados en todos los tipos de celular cerebrales [4], y los últimos descubrimientos en modelos animales demuestran que el rendimiento cognitivo puede verse mejorado a través de los receptores nucleares de los PPARs [5-9].

El PPAR γ es miembro de los PPARs, desempeñando un papel importante en la regulación de la inflamación del sistema nervioso central y la neuroprotección [10,11], lo que contribuye al rendimiento cognitivo [11, 12]. El gen PPAR γ , PPAR γ , se localiza en el cromosoma 3p25 y codifica 3 isoformas: PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3. Variaciones genéticas en PPAR γ se han identificado hasta la fecha, el polimorfismo PPAR γ 2 Pro12Ala (rs1801282) es el que se está estudiando más ampliamente. La mutación genética C→G de este polimorfismo, sustituyendo la prolina (Pro) por alanina (Ala), conduce a una reducción de la afinidad en la unión del ADN y a una alteración transcripcional en los genes diana [13, 14]. El polimorfismo genético Pro12Ala se ha asociado, aunque con falta de coherencia, con un aumento del IMC [15], la obesidad [16], la diabetes Mellitus tipo 2 [17, 18], enfermedades coronarias [19], susceptibilidad de cáncer de mama [20] y otros, incluyendo el deterioro cognitivo y las enfermedades neurodegenerativas [21-23].

En el presente estudio se ha analizado la asociación entre el polimorfismo PPAR γ Pro12Ala en 138 mujeres embarazadas, las concentraciones de ácidos grasos en los fosfolípidos del plasma y en el tejido placentario y el posterior desarrollo neurológico de sus hijos durante los primeros 18 meses de vida, con los siguientes objetivos: 1) *determinar la influencia del polimorfismo Pro12Ala sobre la concentración de ácidos grasos en sangre y en tejido placentario*; 2) *examinar la posible relación*

del polimorfismo PPARG Pro12Ala en mujeres embarazadas con el neurodesarrollo de sus hijos durante los primeros 18 meses de vida.

Material y Métodos

DISEÑO DE ESTUDIO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio PREOBE (*papel de la nutrición y genética maternas en la programación del desarrollo fetal del tejido adiposo*) (www.ClinicalTrials.gov, NCT01634464 2012), es un estudio de cohorte prospectivo observacional en parejas «madre-hijo», que fueron clasificadas en función del índice de masa corporal (IMC) pre-concepcional y el desarrollo de Diabetes Gestacional, determinando los siguientes grupos de estudio: a) embarazadas sanas Normo-peso ($18.5 \leq \text{IMC} < 25 \text{ Kg/m}^2$), Sobrepeso ($25 \leq \text{IMC} < 30 \text{ Kg/m}^2$), Obesas ($\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$), y mujeres que desarrollaron Diabetes Gestacional. El estudio fue realizado en el Hospital Clínico Universitario «San Cecilio» y el Hospital Universitario «Materno infantil».

Los criterios de inclusión fueron: embarazo único, 12 a 20 semanas de gestación en el momento del reclutamiento, intención de dar a luz en uno de los dos Centros Hospitalarios mencionados. Los criterios de exclusión fueron: embarazadas participantes en otros estudios de investigación, que presentaran patologías tales como hipertensión, preeclampsia, retraso del crecimiento intrauterino, infecciones, hipo- o hipertiroidismo, enfermedades renales o hepáticas, o que siguieran una dieta extravagante o vegana. Las posibles variables confusoras se evaluaron mediante cuestionarios estandarizados con información sobre el estado de salud de las madres y de sus hijos. Se obtuvieron datos tales como la edad materna, paridad, tabaquismo, ingesta de alcohol, información sobre hábitos y estilo de vida, datos socio-económicos y demográficos, nivel de estudios, IQ materno, aumento de peso durante la embarazo, tipo de parto, peso placentario, edad gestacional, puntuación de Apgar, sexo del bebé, antropometría neonatal (peso, longitud y perímetro cefálico al nacimiento), tipo de alimentación e introducción de la dieta hasta 18 meses de edad. Se evaluó el nivel de influencia de estos factores considerándolos en el modelo de análisis estadístico desarrollado.

De un total de 331 mujeres embarazadas participantes en el estudio PREOBE, 138 mujeres embarazadas y sus hijos fueron seleccionadas para el presente estudio. Las madres y sus hijos fueron genotipadas para el polimorfismo PPARG Pro12Ala; se realizó una evaluación neurológica de los bebés a los 6 y 18 meses de edad. A los 6 meses 138 niños fueron examinados utilizando las Escalas Bayley de desarrollo infantil, tercera edición (Bayley III). A los 18 meses, 129 bebés fueron sometidos a examen neurológico de nuevo con el Bayley III.

El protocolo de estudio fue aprobado por los comités de ética médica de todos los centros participantes en el estudio. Después de una cuidadosa explicación de los detalles del estudio, el consentimiento informado por escrito se obtuvo de todas las mujeres participantes.

TOMA DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE ADN

Se obtuvo sangre venosa materna y de cordón umbilical en el momento del parto mediante *vacutainer*. La sangre se recogió en tubos de 3.0 mL, conteniendo 7,5% de EDTA, se centrifugó a 3.500 rpm. y almacenó a -80°C hasta el momento del análisis.

GENOTIPADO PPRAG PRO12ALA

Las madres y los bebés fueron genotipados para el polimorfismo Pro12Ala en el exón 3 del gen PPARC (rs1801282 C/G). El ADN genómico se extrajo a partir de la sangre entera usando el protocolo de extracción con fenol-cloroformo y posteriormente se realizó electroforesis en 0,8% de gel de agarosa. La genotipificación se realizó utilizando TaqMan® SNP Genotyping Assay C_1129864_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). La PCR en tiempo real se llevó a cabo de conformidad con el kit de instrucciones y el manual de los fabricantes (Applied Biosystems, Foster City) TaqMan® SNP Genotyping Assays, usando 5 ng de ADN genómico purificado como plantilla. La amplificación se realizó durante 40 ciclos con temperatura de desnaturalización de 95°C y la temperatura de recocido de 60°C.

TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE Y DE PLACENTA PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

La sangre para el análisis de ácidos grasos se recogió en el tubo de suero que contiene activador de coagulación y gel para la separación de suero (Vacutainer, Becton Dickinson, EE.UU.), se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min, y una alícuota se mantuvo a -80°C hasta el momento del análisis.

Las placentas se recogieron y pesaron inmediatamente después del parto. Se realizó una inspección visual de la placenta para estudiar áreas de necrosis o cualquier otra anomalía. Un trozo de 1g se escindió de la mitad del radio de la placenta (*distancia entre la inserción del cordón umbilical y la periferia*), se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C para el análisis de lípidos. Las muestras se obtuvieron de ubicaciones idénticas de la placenta [24].

ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS EN LOS FOSFOLÍPIDOS PLASMÁTICOS

La composición de los ácidos grasos en los fosfolípidos de plasma se determinó utilizando el método desarrollado por Bondía et al., [25] Los lípidos plasmáticos se extrajeron usando diclorometano/metanol (2:1 v/v), y los fosfolípidos fue-

ron aislados por extracción en fase sólida con el uso de columnas de amino-propilo. El análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos de los fosfolípidos del plasma se realizó por cromatografía de gases rápida con un detector de ionización de llama. Los resultados se expresaron como porcentajes (%) del total de ácidos grasos determinados.

ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS DE TEJIDO PLACENTARIO

Se analizaron los lípidos placentarios en 0,2-0,3 g de tejido siguiendo la técnica descrita por Klingler et al., [26]. Brevemente, después de la descongelación de las muestras estas se lavaron varias veces en solución salina al 0,9% para eliminar los residuos sanguíneos lo máximo posible. Se realizó homogeneización y extracción de lípidos en 3 ml de cloroformo/metanol (2:1 v/v), con butil-hidroxitolueno, tripentadecanoil y dipenta-decanoil fosfaditil colina como patrones internos. Las fracciones de lípidos se aislaron por cromatografía en capa fina utilizando heptano, éter di-isopropílico, y ácido acético (60:40:3/volumen) como fase móvil. Los metil-ésteres de los ácidos grasos de las distintas fracciones de plasma y triglicéridos se obtuvieron por reacción con HCl metanólico. Los metil-ésteres de los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gas-líquido capilar en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 serie II (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania) equipado con una columna BPX70 (SGE, Weiterstadt, Alemania, longitud: 25 m, interior diámetro: 0,22 mm) e identificado por comparación con patrones auténticos (Nu-Chek-Pre, Elysian, MN). Los resultados se expresan como porcentajes (%) del total de ácidos grasos detectados.

EVALUACIÓN DEL DESARROLLO NEUROLÓGICO INFANTIL

Se realizó la evaluación neuropsicológica de los niños a los 6 y 18 meses de edad utilizando escalas de Bayley para el desarrollo infantil, tercera edición (BSID III). Esta prueba está diseñada específicamente para niños de 1 a 42 meses de edad [27, 28].

La prueba permite la evaluación del neurodesarrollo mediante cuatro escalas: lenguaje, desarrollo motor, cognitivo y desarrollo social-emocional. La escala del lenguaje explora dos ramas del desarrollo, el lenguaje receptivo y el expresivo. La escala motora permite el examen de ambas habilidades de desarrollo psicomotor, motricidad fina y gruesa. El desarrollo socio-emocional se exploró mediante el cuestionario específico de la escala Bayley que completó la propia madre en el mismo momento de la evaluación. Se calculó la puntuación escalar y la puntuación compuesta para cada escala, y se ajustó para cada niño y edad (días), utilizando las tablas de los manuales de corrección.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS para Windows (versión 20.0; IBM SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

La distribución normal de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las variables normales continuas se muestran como media y desviación estándar, y aquellas que no siguen una distribución normal como amplitud y rango intercuartil. Para las variables categóricas se muestran las frecuencias absolutas y porcentajes. Como posibles factores de confusión se consideraron: la edad materna, la situación socioeconómica, nivel de estudios de los padres, IQ materno, el IMC pre-concepcional, la paridad, el tabaquismo y la ingesta de alcohol durante la gestación, el aumento de peso durante el embarazo, diabetes gestacional, el tipo de parto, peso de la placenta, la edad gestacional, la puntuación de Apgar, la antropometría neonatal (peso, longitud y perímetro cefálico al nacimiento), sexo y tipo de alimentación durante los primeros meses de vida. Con el fin de determinar el posible efecto de los factores de confusión sobre los resultados obtenidos, se realizó prueba t de Student para variables continuas de distribución normal. Para las variables que no seguían una distribución normal, se realizó el test de Wilcoxon o Kruskal-Wallis. La prueba de chi-cuadrado se aplicó para determinar la asociación entre las variables categóricas o categorizadas. Además, se realizó un análisis de regresión logística para relacionar la influencia del polimorfismo PPARG y otras variables sobre los resultados del desarrollo neurológico de los niños (cognitivo, lingüístico, motor y dominios sociales); en este caso, los dominios se dicotomizaron por encima y por debajo del valor de la mediana. El mínimo de significancia se consideró cuando $P < 0,05$.

Resultados

POLIMORFISMO PPARG PRO12ALA EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

La distribución del genotipo PPARG rs1801282 C/G entre la población estudiada fue la siguiente: 118 mujeres (85,5%) tenían el genotipo mayor CC, 20 mujeres (14,5%) presentaron la forma heterocigota de CG; no hubo ninguna mujer con genotipo homocigoto GG. Las respectivas frecuencias de los alelos entre las mujeres fueron: 92,8% (C) y 7,2% (G). Entre los niños, 120 mostraron el genotipo CC, 16 niños el genotipo heterocigoto CG, y un bebé presentó el genotipo GG; las frecuencias alélicas entre los niños fueron de 94% (C) y el 6% (G). PPARG rs1801282 C/G distribución dentro de los participantes del estudio fue de Hardy-Weinberg (en madres $\chi^2 = 0,84$, $p = 0,36$; en lactantes $\chi^2 = 0,06$, $p = 0,47$).

En general, las características maternas y de los hijos no difirieron entre los individuos con el genotipo CC materno o de sus hijos, o con el CG. El polimorfismo

TABLA 1. Características de los individuos estudiados teniendo en cuenta los genotipos maternos del PPARG Pro12Ala (rs1801282, C/G)

		CC (n=118)	CG (n=20)	P
Edad Materna		31.98±4.52	31.70±4.37	0.623**
Ganancia de peso en la gestación ¹		9.38±7.08	8.90±6.69	0.245**
Nivel educativo materno ² Universidad/Doctor	Primaria/Secundaria	36.30%	36.80%	0.963*
	63.70%	63.20%		
IQ Materno ³		108 (18)	100 (25)	0.681**
IMC Pre-concepcional materno ¹		26.54±5.13	26.21±5.25	0.806**
Diabetes Gestacional ²	yes	70.30%	75.00%	0.671*
	no	29.70%	25.00%	
Paridad ²	0	57.60%	35.00%	0.060*
	≥1	42.40%	65.00%	
Tabaco durante la gestación	no	76.90%	83.30%	0.570*
	< 5 cigarillos	17.30%	16.70%	
	≥ 5 cigarillos	5.80%	0.00%	
Alcohol durante el embarazo ²	no	41.30%	55.60%	0.509*
	si	58.70%	44.40%	
Peso placenta ¹		517.3±131.4	472.2±113.7	0.174***
Peso al nacimiento ¹		3320.8±420.2	3544.7±478.0	0.042***
Longitud al nacimiento ¹		50.46±2.12	50.28±2.67	0.920***
Perímetro cefálico al nacimiento ¹		34.56±1.44	34.46±1.49	0.993***
Sexo ²	Niño	45.80%	60.00%	0.239*
	Niña	54.20%	40.00%	
Tipo de alimentación infantil ²	Materna	46.00%	55.50%	0.711*
	Fórmula	36.00%	27.80%	
	Mixta	18.00%	16.70%	
Edad Gestacional ¹		39.51±1.23	39.60±1.18	0.821*
Apgar 1 ³		9 (0)	9 (0)	0.805**
Apgar 5 ³		10 (0)	10 (0)	0.064**

n: número de casos.

IMC: Índice de Masa Corporal; 1. Media ± Desviación Estándar; 2. Porcentaje; 3. Mediana y amplitud intercuartil.

*Test Chi-cuadrado.

**Test Mann Whitney U.

***Test t de Student. Nivel de significancia: P<0.05

Pro12Ala materno se asoció con un mayor peso al nacimiento del bebé; las madres con genotipo CG tuvieron recién nacidos significativamente más pesados que las mujeres con genotipo CC (3544.74 ± 477.99 g vs 3320.76 ± 420.16 g, $P=0.042$). Por tanto, en los análisis estadísticos posteriores el único factor de confusión incluido en los modelos fue el peso al nacimiento. Los otros posibles factores de confusión no se han incluido porque no afectaron al modelo. (Tabla 1).

POLIMORFISMO PPARG PRO12ALA Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN EL MOMENTO PARTO

El polimorfismo Pro12Ala estudiado no mostró ningún efecto sobre las concentraciones de ácidos grasos en plasma materno ni sobre el tejido placentario (Tabla 2). El genotipo del polimorfismo del PPARG Pro12Ala del bebé influyó sobre las concentraciones de ácido α -linolénico en los fosfolípidos de la placenta ($P=0,039$), aunque esta diferencia hay que considerarla con precaución pues sólo había un bebé con el genotipo GG (mientras CC $n=64$, CG $n=9$).

POLIMORFISMO PPARG PRO12ALA Y DESARROLLO NEUROLÓGICO DEL BEBÉ

El genotipo materno no pareció influir en los resultados del desarrollo neurológico del niño a los 6 meses de edad, pero se observaron asociaciones estadísticamente significativas del genotipo materno Pro12Ala y los resultados del desarrollo neurológico de los niños a los 18 meses de edad (Tabla 2). Se obtuvieron puntuaciones más altas en el dominio cognitivo (tanto cognitivo escalar y puntuación compuesta cognitiva, 15(4) vs 13(4), $p=0,004$ y 125(15) vs 115(20), $p=0,004$, respectivamente), el dominio del lenguaje (lenguaje receptivo, 12(2) vs 10.5(2), $p=0,004$), y el dominio motor (motricidad fina y compuesta, 13(3) vs 11.5(2), $p=0,010$ y 115(14) vs 111(8), $p=0,007$, respectivamente), mientras que no se detectaron diferencias en el desarrollo social y emocional de los niños cuyas madres mostraron un genotipo CC, respecto a los niños con genotipo CG materno. El polimorfismo Pro12Ala del bebé no mostró ningún efecto sobre su neurodesarrollo a los 6 y 18 meses de edad (Figura 1).

El análisis de regresión logística mostró que las madres con el genotipo mayoritario del PPARG Pro12 (CC), tienen 5,1 veces más probabilidades de tener un bebé con mayor puntuación compuesta de desarrollo cognitivo a los 18 meses de edad (OR = 5,11; IC del 95%: 1,379 a 18,96) que los nacidos de las mujeres con el genotipo CG ($P=0,015$). El mismo resultado se observó para las puntuaciones lenguaje compuesto y motor compuesto (OR = 3,41; IC del 95%: 1,35 a 11,24; $p = 0,044$ y OR = 4,77; IC del 95%: 1,243 a 18,33, $p = 0,023$, respectivamente) (Tabla 3).

TABLA 2. Concentración de ácidos grasos en los fosfolípidos plasmáticos y placentarios dependiendo del genotipo materno PPARG Pro12Ala (rs1801282, C/G)

	CC	CG	
	X±SD	X±SD	P
Sangre materna al parto (wt %)	n=72	n=14	
LA (C18:2n-6)	22.02±2.64	22.23±1.29	0.682
LNA (C18:3n-3)	0.12±0.04	0.14±0.06	0.205
AA (20:4n-6)	9.77±1.70	10.07±1.42	0.563
DHA (22:6n-3)	4.31±0.90	4.59±1.04	0.512
EPA (20:5n-3)	0.32±0.14	0.33±0.15	0.725
AA/DHA ratio	2.34±0.54	2.31±0.65	0.898
LA/LNA ratio	211.86±87.60	199.93±120.12	0.257
Cordón Umbilical (wt %)	n=50	n=10	
LA (C18:2n-6)	8.02±2.24	7.59±0.73	0.592
LNA (C18:3n-3)	0.04±0.02	0.03±0.01	0.839
AA (20:4n-6)	18.78±2.37	19.51±1.62	0.433
DHA (22:6n-3)	6.78±1.76	6.52±1.17	0.984
EPA (20:5n-3)	0.20±0.07	0.21±0.11	0.960
AA/DHA ratio	2.95±0.82	3.10±0.67	0.513
LA/LNA ratio	269.67±149.47	246.60±95.71	0.858
Fosfolípidos en placenta (wt %)	n=60	n=13	
LA (C18:2n-6)	9.26±1.12	9.51±0.94	0.554
LNA (C18:3n-3)	0.02±0.01	0.03±0.01	0.146
AA (20:4n-6)	21.81±1.67	22.29±1.28	0.289
DHA (22:6n-3)	4.47±0.67	4.94±0.73	0.069
EPA (20:5n-3)	0.08±0.07	0.06±0.06	0.338
AA/DHA ratio	5.00±0.89	4.62±0.81	0.220
LA/LNA ratio	429.47±193.09	455.57±313.80	0.298
Triglicéridos en placenta (wt %)	n=63	n=13	
LA (18:2n-6)	13.27±2.93	11.92±1.55	0.070
LNA (18:3n-3)	0.19±0.09	0.18±0.07	0.761
AA (20:4n-6)	10.55±2.34	11.56±2.31	0.116
DHA (22:6n-3)	3.27±1.05	3.88±1.13	0.073
EPA (20:5n-3)	0.22±0.21	0.24±0.13	0.479
AA/DHA ratio	3.43±0.90	3.20±1.00	0.512
LA/LNA ratio	75.62±22.50	74.39±29.18	0.820

Test U de Mann Whitney; X: Media; SD: Desviación Estándar; n: Número de casos; AA: Ácido araquidónico; DHA: Ácido docosahexaenoico; EPA: Ácido eicopentanoico; LA: Ácido linoico; LNA: Ácido α -linolénico. Resultados expresados en porcentaje por peso (wt %) del total de ácidos grasos detectados.

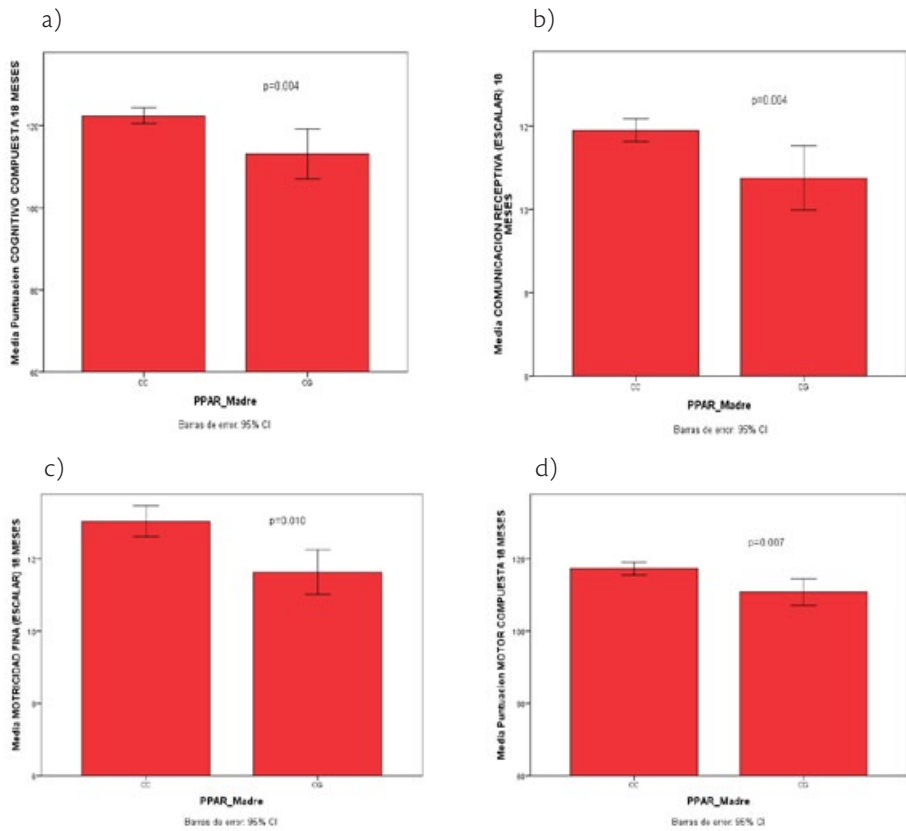


FIGURA 1.

TABLA 3. Análisis de regresión logística de los efectos del genotipo materno PPARG Pro12Ala sobre el neurodesarrollo de los bebés a los 18 meses de edad (n=129)

PPARG (CC)	B	p	Odd's Ratio (95% CI)
Puntuación compuesta Cognitiva	1.632	0.015	5.11 (1.379-18.96)
Puntuación compuesta Lenguaje	1.227	0.044	3.412 (1.035-11.24)
Puntuación compuesta Psicomotor	1.563	0.023	4.775 (1.243-18.33)

Dicotomización por debajo y por encima de la mediana de la puntuación compuesta de desarrollo cognitivo, puntuación compuesta de desarrollo del lenguaje y puntuación compuesta del desarrollo psicomotor, para la regresión logística binaria. Ajustadas por el peso al nacimiento. Variable de riesgo el genotipo PPARG CG

Discusión

En el presente estudio, se ha comprobado que los bebés de madres con genotipo PPARG tipo natural Pro12 superaron a los 18 meses de edad a los portadores del alelo Ala, en las puntuaciones compuestas de desarrollo cognitivo, del lenguaje y de desarrollo motor, pero no en desarrollo socio-emocional, independientemente de la obesidad materna y/o diabetes gestacional. Por otra parte, no se observó ningún efecto del propio polimorfismo Pro12Ala del niño sobre su desarrollo neurológico. Además, las variantes del Pro12Ala no parecen afectar a las concentraciones de ácidos grasos en sangre y placenta durante el parto.

Este es el primer estudio en el que las variaciones del polimorfismo genético del PPARG Pro12Ala se relacionan con el desarrollo neurológico del bebé. Los resultados obtenidos muestran el papel de las variantes polimórficas del Pro12Ala materno en la regulación de los mecanismos intrauterinos implicados en la transferencia transplacentaria de ácidos grasos desde la madre al feto, y por tanto, que van a influir sobre el desarrollo neurológico del bebé; esta influencia tiene un impacto a largo plazo (18 meses en lugar de 6 meses). Se ha demostrado que el PPARG tiene una función específica en la regulación de la expresión de genes implicados en la neurotransmisión, y por lo tanto puede jugar un papel importante en el aprendizaje y el desarrollo de la memoria [27], especialmente en la memoria a largo plazo [5].

El PPARG se expresa fuertemente en la placenta humana [28], y tiene un papel central en la función y el desarrollo placentario [29, 30]. El PPARG actúa como regulador negativo de la invasión trofoblástica del endometrio y está implicado en la secreción de hormonas reguladoras de la reproducción por los trofoblastos [30]. Además, el PPARG juega un papel en el suministro de nutrientes al embrión como regulador de la función metabólica, la regulación de almacenamiento de ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa [29].

Los genes activados por PPARG estimulan la captación de lípidos y la adipogénesis por las células grasas; participa en la regulación de la transferencia de lípidos hacia el feto desempeñando un papel esencial en la placenta, y depende de la incorporación de lípidos de la circulación materna, así como de las vías metabólicas de lípidos dentro de la placenta [31, 32]. La extrema importancia de los ácidos grasos, especialmente ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6 de cadena larga (LC-PUFAs) en el desarrollo del cerebro fetal ha sido ampliamente comprobada [33-35], siendo cruciales para la neurogénesis, la neurotransmisión, y la protección contra el estrés oxidativo [35]. Hay una etapa de crecimiento en la materia gris del cerebro humano durante el último trimestre del embarazo y los primeros meses después del parto, donde se produce una alta acreción de ácido araquidónico y ácido docosahexaenóico (DHA) en el cerebro del feto humano.

Varios estudios han demostrado que una dieta baja en PUFA n-3 disminuye las concentraciones de DHA en los fosfolípidos del plasma, lo que determina a su vez una disminución de los PUFA n-3 en el cerebro; la consecuencia de bajas con-

centraciones de PUFAs n-3 en el cerebro humano conducen a un deterioro cognitivo y efectos negativos en el desarrollo de la conducta [36, 37]. Por lo tanto, la variante materna del PPAR γ 12Ala que se traduce en reducción de la actividad PPAR γ , puede dar lugar una disminución de la transferencia transplacentaria de lípidos hacia el feto, afectando negativamente el desarrollo del cerebro fetal.

El papel del PPAR γ materno podría estar implicado en otros mecanismos placentarios relacionados con el desarrollo neurológico del feto. El PPAR γ contribuye al desarrollo de la placenta, y por lo tanto a la transferencia materno-fetal de oxígeno y de diferentes nutrientes que permiten el crecimiento fetal, incluyendo el desarrollo cerebral. Se ha demostrado una relación positiva de la expresión placentaria del PPAR γ con el peso fetal y placentario [38]. Se sabe que hay nutrientes esenciales para el desarrollo cerebral durante la vida fetal, que van a influir no sólo en el desarrollo morfológico, sino también en la función cerebral incidiendo sobre la neuroquímica y el desarrollo neuropsicológico; el efecto de la nutrición en estas etapas precoces de la vida puede tener un impacto duradero a muy largo plazo [35]. Esta hipótesis, sin embargo, debe ser confirmada en futuros estudios.

El presente estudio tiene diversas limitaciones; no se ha podido comprobar ninguna diferencia en las concentraciones de ácidos grasos en plasma ni en tejido placentario entre mujeres y niños con los diferentes genotipos Pro12Ala estudiados. La falta de asociación entre las concentraciones de los polimorfismos y las de ácidos grasos en la placenta, podría ser el resultado de la preparación de la muestra, pues se obtuvo parte tanto de la cara materna como de la fetal, habiéndose analizado una mezcla de las mismas. Otra explicación podría ser el número limitado de muestras disponibles para el análisis de los ácidos grasos (especialmente entre los portadores del alelo Ala), lo que ha disminuido la potencia estadística.

Por otro lado, no se han encontrado asociaciones significativas entre el genotipo Pro12Ala y los niveles de lípidos plasmáticos, pero las diferencias aparecieron después de 24 semanas de dieta de ácidos grasos [39]. En ratones se ha demostrado que el PPAR γ desempeña un papel en el cerebro en la regulación del apetito, y por tanto, la variación genética de este gen puede estar relacionada con la ingesta diaria [40]. De hecho, un estudio reciente en humanos ha demostrado diferencias significativas en la ingesta total de grasa en la dieta, en relación con los genotipos Pro12Ala, donde los participantes portadores del alelo 12Ala tuvieron mayor ingesta de grasas respecto a los no portadores [41].

Conclusión

Los resultados del estudio que se presenta muestran que los bebés nacidos de madres con el genotipo Pro12 tienen mejores resultados de desarrollo neurológico a los 18 meses de edad respecto a las portadoras del alelo Ala, lo que indicaría el papel a largo plazo de las variantes del PPAR γ sobre el desarrollo del cerebro fetal,

al actuar sobre la transferencia transplacentaria de nutrientes. Las variantes resultan de la actividad del receptor disminuido PPARG 12Ala, lo que puede conducir a una transferencia de lípidos disminuida para el feto y por tanto, afectarían negativamente el desarrollo del cerebro fetal. Sin embargo, el genotipo Pro12Ala no parece tener efecto alguno sobre las concentraciones de ácidos grasos en los fosfolípidos del plasma ni en los placentarios. Los resultados presentados en este estudio deberían ser replicados, así como el impacto del polimorfismo PPARG Pro12Ala sobre el neurodesarrollo debería ser ampliamente estudiado.

Agradecimientos y financiación

Un agradecimiento para todo el equipo implicado en el Proyecto PREOBE, por su tenacidad y afán de hacer un buen trabajo. Un agradecimiento muy especial para todas las madres y padres de los niños participantes en el proyecto PREOBE que año tras año están confiando en nosotros y ofreciéndonos también su tiempo y esfuerzo para completar todos las tareas que les proponemos, y siempre con una actitud muy positiva. Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía, convocatoria de Proyectos de Excelencia (P06-CTS-02341) y por el Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. Ref. BFU2012-40254-C03-01.

Bibliografía

1. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53:409-35. Epub 2002/01/31.
2. Capobianco E, Martinez N, Fornes D, Higa R, Di Marco I, Basualdo MN, et al. PPAR activation as a regulator of lipid metabolism, nitric oxide production and lipid peroxidation in the placenta from type 2 diabetic patients. *Molecular and cellular endocrinology.* 2013;377(1-2):7-15. Epub 2013/07/03.
3. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. *Cell.* 2005;123(6):993-9. Epub 2005/12/20.
4. Aleshin S, Strokin M, Sergeeva M, Reiser G. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)beta/delta, a possible nexus of PPARalpha- and PPARgamma-dependent molecular pathways in neurodegenerative diseases: Review and novel hypotheses. *Neurochemistry international.* 2013;63(4):322-30. Epub 2013/07/03.
5. Hajjar T, Meng GY, Rajion MA, Vidyadaran S, Othman F, Farjam AS, et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPARalpha and PPARgamma) gene expression in rats. *BMC neuroscience.* 2012;13:109. Epub 2012/09/20.
6. Katsouri L, Blondrath K, Sastre M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma cofactors in neurodegeneration. *IUBMB life.* 2012;64(12):958-64. Epub 2012/11/07.

7. Ormerod BK, Hanft SJ, Asokan A, Haditsch U, Lee SW, Palmer TD. PPARgamma activation prevents impairments in spatial memory and neurogenesis following transient illness. *Brain, behavior, and immunity*. 2013;29:28-38. Epub 2012/10/31.
8. Skerrett R, Malm T, Landreth G. Nuclear receptors in neurodegenerative diseases. *Neurobiology of disease*. 2014. Epub 2014/05/31.
9. Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, et al. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn Mem*. 2009;16(5):332-7. Epub 2009/05/01.
10. Pathan AR, Gaikwad AB, Viswanad B, Ramarao P. Rosiglitazone attenuates the cognitive deficits induced by high fat diet feeding in rats. *European journal of pharmacology*. 2008;589(1-3):176-9. Epub 2008/07/08.
11. Deplanque D. [Cell protection through PPAR nuclear receptor activation]. *Therapie*. 2004;59(1):25-9. Epub 2004/06/18. Protection cellulaire par activation des recepteurs nucleaires PPAR.
12. Rinwa P, Kaur B, Jaggi AS, Singh N. Involvement of PPAR-gamma in curcumin-mediated beneficial effects in experimental dementia. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2010;381(6):529-39. Epub 2010/04/07.
13. Razquin C, Marti A, Martinez JA. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPARgamma. Approaches for personalized nutrition. *Molecular nutrition & food research*. 2011;55(1):136-49. Epub 2011/01/06.
14. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature genetics*. 1998;20(3):284-7. Epub 1998/11/07.
15. Galbete C, Toledo E, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA, Guillen-Grima F, Marti A. Pro12Ala variant of the PPARG2 gene increases body mass index: An updated meta-analysis encompassing 49,092 subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(7):1486-95. Epub 2013/05/15.
16. Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2005;162(2):101-14. Epub 2005/06/24.
17. Chan KH, Niu T, Ma Y, You NC, Song Y, Sobel EM, et al. Common genetic variants in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARG) and type 2 diabetes risk among Women's Health Initiative postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(3):E600-4. Epub 2013/02/07.
18. Trombetta M, Bonetti S, Boselli ML, Miccoli R, Trabetti E, Malerba G, et al. PPARG2 Pro12Ala and ADAMTS9 rs4607103 as «insulin resistance loci» and «insulin secretion loci» in Italian individuals. The GENFIEV study and the Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study (VNDS) 4. *Acta diabetologica*. 2013;50(3):401-8. Epub 2012/11/20.
19. Wu Z, Lou Y, Jin W, Liu Y, Lu L, Lu G. The Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene (PPARGgamma2) is associated with increased risk of coronary artery disease: a meta-analysis. *PloS one*. 2012;7(12):e53105. Epub 2013/01/10.

20. Mao Q, Guo H, Gao L, Wang H, Ma X. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 Pro12Ala (rs1801282) polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Molecular medicine reports*. 2013;8(6):1773-8. Epub 2013/10/22.
21. West NA, Haan MN, Morgenstern H. The PPAR-gamma Pro12Ala polymorphism and risk of cognitive impairment in a longitudinal study. *Neurobiology of aging*. 2010;31(5):741-6. Epub 2008/07/22.
22. d'Abramo C, Zingg JM, Pizzuti A, Argellati F, Pronzato MA, Ricciarelli R. In vitro effect of PPAR-gamma2 Pro12Ala polymorphism on the deposition of Alzheimer's amyloid-beta peptides. *Brain research*. 2007;1173:1-5. Epub 2007/09/07.
23. He W. PPARgamma2 polymorphism and human health. *PPAR research*. 2009;2009:849538. Epub 2009/04/25.
24. Mayhew TM. Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies. *Placenta*. 2008;29(1):1-14. Epub 2007/07/31.
25. Bondia-Pons I, Morera-Pons S, Castellote AI, Lopez-Sabater MC. Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography. *Journal of chromatography A*. 2006;1116(1-2):204-8. Epub 2006/04/06.
26. Klingler M, Demmelmair H, Larque E, Koletzko B. Analysis of FA contents in individual lipid fractions from human placental tissue. *Lipids*. 2003;38(5):561-6. Epub 2003/07/26.
27. Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*. 2004;123(1):131-45. Epub 2003/12/12.
28. Tugwood JD, Aldridge TC, Lambe KG, Macdonald N, Woodyatt NJ. Peroxisome proliferator-activated receptors: structures and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996;804:252-65. Epub 1996/12/27.
29. Schaiff WT, Knapp FF, Jr, Barak Y, Biron-Shental T, Nelson DM, Sadovsky Y. Ligand-activated peroxisome proliferator activated receptor gamma alters placental morphology and placental fatty acid uptake in mice. *Endocrinology*. 2007;148(8):3625-34. Epub 2007/04/28.
30. Abbott BD. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reprod Toxicol*. 2009;27(3-4):246-57. Epub 2008/11/11.
31. Herrera E, Amusquivar E, Lopez-Soldado I, Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Hormone research*. 2006;65 Suppl 3:59-64. Epub 2006/04/14.
32. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free radical research*. 2010;44(10):1125-71. Epub 2010/09/15.
33. Krauss-Etschmann S, Shadid R, Campoy C, Hoster E, Demmelmair H, Jimenez M, et al. Effects of fish-oil and folate supplementation of pregnant women on maternal and fetal plasma concentrations of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid: a European randomized multicenter trial. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(5):1392-400. Epub 2007/05/11.

34. Campoy C, Escolano-Margarit MV, Anjos T, Szajewska H, Uauy R. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br J Nutr.* 2012;107 Suppl 2:S85-106. Epub 2012/05/25.
35. Anjos T, Altmäe S, Emmett P, Tiemeier H, Closa-Monasterolo R, Luque V, et al. Nutrition and neurodevelopment in children: focus on NUTRIMENTHE project. *Eur J Nutr.* 2013;52(8):1825-42. Epub 2013/07/26.
36. Su HM. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem.* 2010;21(5):364-73. Epub 2010/03/18.
37. Noaghiul S, Hibbeln JR. Cross-national comparisons of seafood consumption and rates of bipolar disorders. *Am J Psychiatry.* 2003;160(12):2222-7. Epub 2003/11/26.
38. Diaz M, Bassols J, Lopez-Bermejo A, Gomez-Roig MD, de Zegher F, Ibanez L. Placental expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): relation to placental and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(8):E1468-72. Epub 2012/06/13.
39. Alsaleh A, O'Dell SD, Frost GS, Griffin BA, Lovegrove JA, Jebb SA, et al. Interaction of PPARG Pro12Ala with dietary fat influences plasma lipids in subjects at cardio-metabolic risk. *J Lipid Res.* 2011;52(12):2298-303. Epub 2011/09/29.
40. Lu M, Sarruf DA, Talukdar S, Sharma S, Li P, Bandyopadhyay G, et al. Brain PPAR-gamma promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. *Nat Med.* 2011;17(5):618-22. Epub 2011/05/03.
41. Bouchard-Mercier A, Paradis AM, Perusse L, Vohl MC. Associations between polymorphisms in genes involved in fatty acid metabolism and dietary fat intakes. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2012;5(1):1-12. Epub 2012/03/15.

Efecto preventivo de ketamina intraoperatoria sobre el dolor postoperatorio en cirugía laparoscópica con Anestesia Total Intravenosa

García-Henares JF, Morales C, Montes R.

Resumen

Numerosos ensayos clínicos demuestran que la ketamina, un antagonista no competitivo del receptor glutamatérgico NMDA, previene la hiperalgesia secundaria a opioides. No obstante, hay pocos ensayos clínicos que estudien la eficacia y tolerabilidad de la ketamina en cirugía mayor de mínima estancia hospitalaria. La aparición de hiperalgesia inducida por opioides potentes de vida media corta, como el remifentanilo, está ampliamente descrita en la literatura y dificulta el manejo del dolor postoperatorio en cirugía laparoscópica.

Planteamos un estudio experimental para evaluar la eficacia de la ketamina en anestesia total intravenosa para cirugía laparoscópica abdominal y ginecológica. Se reclutaron 53 pacientes con riesgo anestésico según la escala ASA I-II. El grupo experimental fue asignado a recibir ketamina pre-incisión y de mantenimiento (K, n=25) frente al grupo control (C, n=28), éste último obtenido mediante el registro retrospectivo de pacientes de similar patología médico-quirúrgica intervenidos en el mismo centro. Ambos grupos recibieron anestesia general intravenosa con remifentanilo y la misma pauta analgésica intraoperatoria y postoperatoria. No hubo diferencias en cuanto a peso, edad o escala ASA. Se evaluaron: la escala analgésica visual (EVA) a la llegada a la Unidad de Reanimación, la EVA horaria y el consumo total de morfínico durante la estancia en la Unidad de Reanimación.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en las 3 variables principales recogidas en el estudio. Se registró un EVA a la llegada a la Unidad de Reanimación de $1,56 \pm 2,08$ puntos en el grupo K, frente a $3,86 \pm 2,94$ en el grupo C ($p=0,004$). El tiempo medio de estancia en reanimación para conseguir un $EVA < 3$ fue para el grupo K $0,48 \pm 0,59$ h mientras el grupo C necesitó una media de $1,68 \pm 1,31$ h ($p=0,0001$). El consumo de morfínico durante la estancia en la Unidad de Reanimación fue de $1,92 \pm 2,86$ mg en el grupo K, frente a $4,71 \pm 4,72$ mg en el grupo control ($p < 0,014$). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a la aparición de náuseas y vómitos en el postoperatorio. Tampoco se observaron efectos secun-

darios atribuibles a la ketamina, como alucinaciones, sedación, agitación o delirio, en el grupo de estudio.

El empleo intraoperatorio de remifentanilo es una práctica común que facilita el manejo de la anestesia durante la cirugía laparoscópica y permite conseguir un despertar precoz tras la cirugía, aunque induce hiperalgesia, la cual dificulta el control del dolor postoperatorio. En resumen, utilizada en TIVA (Total Intravenous Anaesthesia) durante la cirugía laparoscópica de mínima estancia hospitalaria, la ketamina administrada antes de la incisión a dosis subanalgésicas, y durante el mantenimiento de la anestesia junto con remifentanilo, mostró ser eficaz en la disminución del dolor postoperatorio y el consumo de morfíco en la Unidad de Reanimación. Además, la reducción del consumo de morfíco se consiguió sin la aparición de los efectos secundarios centrales propios de la ketamina en el postoperatorio.

Introducción

La cirugía laparoscópica es un procedimiento de alta resolución y de acceso mínimo. Sin embargo, se requieren altas dosis de opioides en momentos concretos de la intervención, debido a la estimulación simpática que provoca el neumoperitoneo y al propio acto quirúrgico [18]. En este tipo de cirugía la administración de remifentanilo, un potente agonista- μ de vida media corta, permite adecuar el estado anestésico oscilante, facilita su mantenimiento y el despertar precoz [30]. La infusión intraoperatoria de remifentanilo tiene como efecto paradójico la aparición de hiperalgesia, lo que dificulta y complica el control del dolor agudo postoperatorio [8]. Ya en el siglo XIX se describió que pacientes con dolor crónico tratados con un potente analgésico como la morfina, desarrollaban «... *un curioso estado de dolor perpetuo*» [1]. Numerosas evidencias preclínicas y clínicas sugieren que la administración de opiáceos, además de analgesia, pueden provocar una sensibilización paradójica. Este fenómeno, conocido como hiperalgesia inducida por opiáceos (HIO), se ha descrito tanto tras administración crónica, como aguda de opiáceos mayores de diferente clase, como el remifentanilo, el fentanilo o la morfina [8,16,21,5,31,17].

La sensibilización nociceptiva que ocurre tras estimulación nociva periférica repetitiva y la HIO, son procesos fisiopatológicos que se establecen durante y después de la intervención quirúrgica, lo que favorece la aparición de dolor agudo postoperatorio y conlleva la necesidad de administración de opiáceos mayores en la fase postoperatoria. El manejo del dolor agudo postoperatorio está limitado por los efectos adversos de los morfícos, como apnea, sedación, náuseas y vómitos postoperatorios (NVPO). Tales efectos secundarios afectan al bienestar del paciente y aumentan el coste sanitario al incrementar la necesidad de cuidados por el personal de enfermería y prolongar la estancia en la Unidad de Reanimación Postoperatoria Anestésica (URPA) [26,11].

Los mecanismos que subyacen al fenómeno de sensibilización central tras lesión tisular y la HIO han sido objeto de intenso estudio. Se ha sugerido que ambos procesos compartirían aspectos comunes en los que está implicada la activación del receptor N-Metil-D-Aspartato glutamatérgico (NMDA) [20,21,24,22,23,36,28,9,27,25,17]. Además, ensayos *in vitro* muestran que el remifentanilo activa el receptor NMDA [9]. Se ha sugerido que la activación del receptor opioide- μ inicia una cascada de eventos comenzando con la translocación de la PKC del citosol a la membrana, que permite al receptor NMDA comportarse como canal ligando-dependiente al eliminar el bloqueo voltaje-dependiente del Mg^{2+} . El desplazamiento del Mg^{2+} favorece el influjo de Ca^{2+} , a pesar de la hiperpolarización producida por activación del receptor opioide- μ y la escasa liberación presináptica de glutamato por el nociceptor [20,24,36,5]. Por su parte, la liberación de glutamato por aferencias nociceptivas en respuesta a estímulos nocivos intensos y/o prolongados, lesión tisular e inflamación local inducidas por la cirugía, activaría al receptor NMDA, resaltando su participación en mecanismos de sensibilización nociceptiva [6,4,28].

El papel fisiopatológico del receptor NMDA, explica parcialmente el efecto analgésico preventivo de la ketamina y otros antagonistas-NMDA administrados antes de producir el daño tisular durante la cirugía. La ketamina prevendría la activación de las mencionadas cascadas intracelulares responsables de la sensibilización nociceptiva y la HIO [13,29]. Otros autores han propuesto neuroadaptaciones pronociceptivas alternativas como responsables de aparición de HIO [35,31,17].

La ketamina, un potente antagonista no-competitivo del receptor NMDA, se utilizó en la década de los años 60 como anestésico general disociativo porque induce un estado de desconexión con el entorno sin pérdida de reflejos profundos. Su administración en bolus intravenoso (i.v.) a dosis altas (1-2,5 mg/kg), para la inducción de anestesia general, se asocia frecuentemente a la aparición de efectos psicoticomiméticos graves en forma de psicosis, alucinaciones o crisis de pánico, controlables con la coadministración de benzodiacepinas. Se ha demostrado que estos efectos secundarios son dosis-dependientes y no aparecen con el uso de ketamina a dosis bajas [3,25]. Otros efectos secundarios de la administración de dosis anestésicas de ketamina, como taquicardia, aumento de presión arterial, o agravamiento de estados previos de hipertensión intracraneal, no se describen a dosis subanalgésicas de 0,5 mg/kg [3,13].

En la síntesis de ketamina se obtienen dos esteroisómeros R y S en mezcla racémica. Sin embargo, algunos estudios realizados en dolor postoperatorio utilizan S-ketamina que posee una farmacocinética similar a la mezcla racémica, pero con mayor potencia analgésica y efectos psicoticomiméticos menores [3]. Mientras que la S-ketamina se ha comercializado en otros países de la Unión Europea, nuestro medio hospitalario solo dispone de la mezcla racémica (Ketolar, Pfizer) que se puede administrar por varias vías [19].

Recientemente se han publicado numerosos estudios que destacan el papel de la ketamina como analgésico simple o coadyuvante en el dolor postoperatorio

[15,32,3,13,19,37]. La Asociación Cochrane, en un exhaustivo meta-análisis, avala el uso de ketamina como coadyuvante analgésico a bajas dosis (subanestésicas y/o subanalgésicas), ya que reduce en un 30-50% el consumo de morfínicos postoperatorio, y consecuentemente la incidencia de NVPO, y sus efectos psicoticomiméticos son leves, pasajeros y poco frecuentes [3]. Aunque otros autores no encuentran reducción significativa en los efectos colaterales de los opiáceos [32], se ha demostrado que el uso de ketamina a dosis subanestésicas (0,5 mg/kg) disminuye la hiperalgesia inducida por remifentanilo intraoperatorio, reduce el consumo de morfínicos postoperatorio, y los NVPO asociados a su uso [13].

Por otra parte, se ha propuesto que la administración de ketamina pre-incisión en cirugía laparoscópica es más eficaz a nivel analgésico que su administración tras la intervención quirúrgica, una vez finalizada la estimulación nociceptiva. La pauta de ketamina pre-incisión a dosis subanalgésicas (0,15 mg/kg), mejora los resultados de la Escala Visual Analógica (EVA) al despertar, prolonga el tiempo hasta el primer rescate analgésico y disminuye el consumo total de morfínicos en el postoperatorio [15]. La eficacia de la ketamina en la prevención de hiperalgesia podría estar potenciada en este estudio clínico, por la coadministración de óxido nítrico e isoflurano, ya que *in vitro* el isoflurano y otros agentes halogenados inhiben al receptor NMDA [12]. Sería interesante estudiar si el efecto de la ketamina sobre el dolor postoperatorio se mantiene sin el posible efecto potenciador que proporcionan los anestésicos volátiles.

Los numerosos ensayos clínicos revisados, muestran una gran heterogeneidad en el diseño, tipo de intervención, vía, dosis y tiempo de administración. Aunque se ha mostrado que dosis tan bajas como 0,15 mg/kg en *bolus* único, son eficaces en cirugía laparoscópica ginecológica [15], la heterogeneidad de los ensayos clínicos y los resultados controvertidos, no señalan una dosis óptima de utilización de ketamina. Por lo que parece necesario individualizar la pauta de administración de ketamina, al tipo y duración de la cirugía.

En base a las propiedades farmacocinéticas de la ketamina [7], se ha sugerido que la dosis óptima de ketamina para cirugía mayor abdominal con laparotomía se conseguiría con un *bolus* inicial de 0,5 mg/kg y una perfusión intraoperatoria de 5 µg/kg/min, para alcanzar una concentración plasmática de ketamina intraoperatoria de 0,25 µg/ml y una postoperatoria de 0,1 µg/ml. Esta pauta de administración contrarresta la hiperalgesia inducida por opiáceos con mínimos efectos secundarios [13].

El objetivo de la presente investigación es encontrar una pauta de administración acorde a las necesidades analgésicas en cirugía laparoscópica. Se ha planteado como un estudio experimental preliminar (*prospectivo-retrospectivo*) donde se evalúe la tolerabilidad y eficacia analgésica preventiva de dosis subanalgésicas de ketamina, perfundida junto a remifentanilo como modalidad de Anestesia Total Intravenosa (TIVA *acrónimo inglés para una modalidad de anestesia libre de agentes anestésicos volátiles*).

MÉTODOS

En un estudio observacional previo realizado en 10 pacientes sometidas a cirugía laparoscópica abdominal ginecológica se registró el consumo medio de cloruro mórfico postoperatorio de $5,09 \pm 3,12$ mg, durante su estancia en la URPA del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Asumiendo una reducción de al menos 30% en el consumo de mórfico en un grupo experimental tratado con ketamina (Bell et al., 2005), el tamaño muestral para conseguir una potencia estadística del 80% que detecte diferencias en el contraste de la hipótesis nula mediante el test de *Student* bilateral para dos muestras independientes, fue de 60 pacientes por grupo, para un grado de significación estadística del 5%.

El estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación y el Comité de Ética del Hospital, y los datos de los pacientes se trataron siguiendo la Ley de Protección de datos. El anestesta explicó a los pacientes los detalles del estudio, el carácter voluntario de su participación, las ventajas e inconvenientes de la técnica, y su naturaleza experimental, tras lo cual firmaron un consentimiento informado.

SUJETOS

El Grupo experimental prospectivo a tratar con ketamina (Grupo K), se constituyó con 4 varones y 21 mujeres ($41 \pm 12,4$ años de edad) propuestos para cirugía laparoscópica (quistectomía ovárica $n=19$; colecistectomía $n=6$), y reclutados en la consulta de Anestesia con los siguientes criterios de exclusión:

- Ingesta crónica de alcohol o ADVP (Adicción a Drogas por Vía Parenteral)
- Antecedentes de psicosis, o consumo crónico de *cannabis*
- Hipertensión intracraneal, lesiones cerebrales, epilepsia
- Hipertensión arterial descontrolada o pre-eclamsia
- Cardiopatía isquémica o arritmogénica
- Glaucoma crónico de ángulo abierto
- Pacientes clasificados con un ASA ≥ 3

Los integrantes del grupo control (Grupo C) se obtuvieron a partir del registro retrospectivo de pacientes intervenidos de cirugía laparoscópica durante los 3 meses previos, y los 3 meses de duración del estudio en el mismo Hospital (quistectomía ovárica $n=22$; colecistectomía $n=6$). El Grupo C se consolidó con 1 varón y 27 mujeres, ($N=28$), con una media de $35 \pm 1,3$ años de edad. Antes de la intervención se adiestró a los pacientes, en el uso de la EVA. Se registró su peso y el Sistema de Clasificación del Riesgo Anestésico ASA de la *American Society of Anesthesiologists*.

PROTOCOLO ANESTÉSICO

Tras premedicación con 4 mg dexametasona, y 0,03 mg/kg midazolam, ambos Grupos de pacientes recibieron la misma pauta analgésica intra- y postoperatoria. Una vez monitorizados, se les indujo la anestesia con propofol 3 mg/kg, fentanilo 2 µg/kg, y cisatracurio 0,15 mg/kg. Seguidamente el Grupo C recibió antes de la incisión quirúrgica TIVA exclusivamente con remifentanilo intraoperatorio, mientras al Grupo K se le administró 0,15 mg/kg de ketamina en bolus seguida de TIVA en perfusión de ketamina+remifentanilo (20:1). La solución se preparó en la misma jeringa con 40 mg de ketamina y 2 mg de remifentanilo, diluida hasta 20 ml con suero salino fisiológico. Con esta composición se consigue una perfusión proporcional de ketamina 2-4 µg/kg/min (menor que la utilizada en cirugía abdominal abierta por Joly et al., 2005), y de remifentanilo 0,10-0,20 µg/kg/min. Al comienzo de la intervención se inició una perfusión de remifentanilo 0,10 µg/kg/min. Cuando fue necesaria mayor analgesia durante la cirugía (PAM, FC >20% basal o índice bispectral «BIS» con trazado irregular), sin indicio de estimulación simpática atribuible al neumoperitoneo; se administró un bolus de ketamina 6 µg/kg + remifentanilo 0,3 µg/kg, y se escaló un 50% la dosis/min administrada, a demanda. *TÉCNICA ANESTÉSICA: General intravenosa total (TIVA, Total Intravenous Anaesthesia) con Remifentanilo. FiO₂ (Fracción Inspirada de Oxígeno) 40%. Mantenimiento BIS (Índice Bispectral) 35-55. TOF 1-2 respuestas.*

Durante el mantenimiento anestésico se administró oxígeno al 40%, continuando en perfusión cisatracurio 0,5 µg/kg/min y propofol 4 mg/kg/h. Se monitorizó tanto el grado de relajación neuromuscular (*para mantener un rango menor a 3 respuestas*), como la profundidad anestésica (*para mantener un BIS entre 35-55*). Al final de la cirugía el bloqueo motor residual fue antagonizado con neostigmina 40 µg/kg y atropina 20 µg/kg. Treinta minutos antes de acabar la cirugía, los pacientes recibieron por vía intravenosa paracetamol 15 mg/kg y dexketoprofeno 0,7 mg/kg, además del antiemético ondansetrón 0,06 mg/kg, y 0,10 mg/kg de cloruro mórfico. Una vez completada la cirugía se extubó al paciente, cuando obedecía a órdenes y realizaba movimientos respiratorios coordinados de buena amplitud.

Tras la intervención los sujetos fueron trasladados a la URPA donde fueron monitorizados. Durante su estancia se registraron las siguientes variables: EVA a la llegada y EVA horaria, presión arterial, frecuencia cardiaca, y el porcentaje de saturación de oxígeno en sangre arterial medido por pulsioximetría. El tratamiento analgésico postoperatorio en ambos Grupos se pautó con una perfusión de dexketoprofeno 2 mg/kg/24h y metamizol 90 mg/kg/24h. La analgesia se consideró adecuada cuando el paciente presentaba una EVA<3 ó demandaba analgesia. Como rescate analgésico se administró cloruro mórfico 3 mg i.v. cada 10 minutos, hasta conseguir una correcta analgesia. Posteriormente se registraron: el tiempo de estancia en reanimación hasta conseguir un EVA<3, el número de rescates de cloruro mórfico, y la aparición de eventos adversos como NVPO, alucinaciones, disociación o crisis psicóticas.

Los datos fueron analizados mediante el software estadístico SPSS 15.0. Para verificar la distribución normal de variables, se realizó la prueba de Kolmogorov Smirnov. Para la comparación de las variables sexo, ASA, tipo de intervención se empleó el test Chi-Cuadrado, mientras que para las variables edad y peso se usó el test t-Student. Las variables dependientes cuantitativas EVA, Tiempo EVA<3 y consumo de mórnicos, no siguen una distribución normal, por lo que en las comparaciones entre grupos se utilizó el test de U-Mann-Whitney para muestras independientes. El nivel de significación estadística se estableció para $p < 0,05$. En los Resultados los datos se expresan como media $\pm$ DE (desviación estándar).

Resultados

Aunque los criterios de normalidad se cumplen para las variables edad y peso (excepto para la edad en el Grupo K), dado que el tamaño muestral es >20 en cada grupo, se utilizó el test paramétrico t-Student. El análisis de las variables sexo, ASA y tipo de intervención no mostró diferencias significativas entre pacientes de ambos grupos sometidos al estudio (Tabla 1).

TABLA 1. Grupos de pacientes y características

		Grupo K	Grupo C	p
Sexo	mujer	21	27	0,176 ¥
	varón	4	1	
Edad		41 $\pm$ 12,4	35 $\pm$ 11,3	0,065
Peso		69 $\pm$ 11,7	63 $\pm$ 10,9	0,062
ASA	ASA 1	15	14	0,65 ¥
	ASA 2	10	14	
Intervención	Colec.	6	6	0,68 ¥
	Quist.	19	22	

Colec.= colecistectomía. Quist.= quistectomía/anexectomía ovárica simple.

¥=Test Chi-Cuadrado. t-Student. p=significación estadística.

TABLA 2. Variables principales recogidas en el estudio.

	Grupo	N	media ± DE	diferencia medias	IC 95%	P
EVA _r	Ketamina	25	1,56 ± 2,08	-2,3	[-3,71 - -0,876]	0,004
	Control	28	3,86 ± 2,94			
tEVA<3 (h)	Ketamina	25	0,48 ± 0,59	-1,2	[-1,77 - -0,63]	0,0001
	Control	28	1,68 ± 1,31			
Morf _R	Ketamina	25	1,92 ± 2,86	-2,79	[-4,98 - -0,61]	0,014
	Control	28	4,71 ± 4,72			

EVA_r=Escala analgésica visual al entrar en Reanimación.

tEVA <3=tiempo de estancia en Reanimación hasta conseguir EVA menor de 3.

Morf_R=Dosis total de mórfico administrado en Reanimación.

Test deMann–Whitney para muestras independientes.

A la entrada en Reanimación, la puntuación de dolor (valorada con la EVA) en pacientes que recibieron ketamina fue 2,3 puntos más baja que en el Grupo Control ($p=0,004$). Así mismo, el tiempo medio de estancia en Reanimación hasta conseguir un EVA<3, fue significativamente menor en el Grupo K ($0,48 \pm 0,59$ h) respecto al Grupo C ($1,68 \pm 1,31$ h; $p=0,0001$), de modo que los pacientes tratados con ketamina consiguieron una correcta analgesia 1,2 h antes. También se redujo significativamente el consumo total de mórfico del Grupo K ($1,92 \pm 2,86$ mg) frente al Grupo C ($4,71 \pm 4,72$ mg; $p=0,014$). Es decir los pacientes que recibieron ketamina durante la intervención, necesitaron un promedio de 2,71 mg menos de morfina en los rescates realizados en la URPA (Tabla 2).

La incidencia de NVPO fue mayor en el Grupo Control (14%) que en el Grupo K (4%), aunque esta diferencia no alcanzó significación ($p=0,067$). No se observaron efectos secundarios en ningún paciente durante la infusión de ketamina. Además, los pacientes del Grupo K tampoco sufrieron episodios psicóticos en forma de alucinaciones o sueños vívidos, durante el postoperatorio o la estancia hospitalaria.

Discusión

El empleo intraoperatorio de opioides de vida media corta facilita el manejo anestésico en la cirugía laparoscópica. Por las características intrínsecas de esta cirugía y/o del paciente se demandan altas dosis de estos fármacos en momentos concretos de la intervención [18]. La alta exposición a opioides de vida media corta

como el remifentanilo inducen un estado de hiperalgesia dependiente de la dosis [8,13], que se puede prevenir utilizando antagonistas del receptor NMDA como la ketamina [3,13].

El protocolo de administración de ketamina utilizado en este estudio se diferencia del de otros estudios previos, en que individualiza las dosis de ketamina intraoperatoria a la demanda analgésica de remifentanilo por cada paciente. Así, incluyendo la ketamina dentro de la perfusión de remifentanilo, la administración de ambos fármacos es proporcional. En nuestro estudio se han usado las dosis mínimas de ketamina pre-incisión en bolus que han demostrado ofrecer analgesia preventiva en cirugía laparoscópica [15], continuada con una perfusión de ketamina que ha demostrado ser eficaz en la reducción del consumo de morfínicos postoperatorio, sin asociarse a la aparición de efectos psicoticomiméticos [13,37]. Los resultados preliminares de este estudio sugieren que pequeñas dosis de ketamina (0,15 mg/kg) en bolus antes de la incisión, seguida de ketamina (2-4 µg/kg/min) y remifentanilo (0,10-0,20 µg/kg/min) en la misma perfusión con la modalidad TIVA, mejoran la EVA al despertar, reducen el consumo total de morfínicos y el tiempo necesario para alcanzar una correcta analgesia (EVA<3) en la URPA. Haber utilizado un Grupo de pacientes control retrospectivo, limita nuestro estudio, ya que no se puede suponer la homogeneidad completa e impide una correcta aleatorización y del enmascaramiento de la exposición en los sujetos experimentales.

No obstante nuestros resultados concuerdan con otros estudios clínicos aleatorizados controlados con placebo, que demuestran que pequeñas dosis de ketamina antes de la incisión quirúrgica disminuyen el dolor postoperatorio y reducen el consumo de morfínicos [15,3,13]. La disminución de los requerimientos de morfínicos y la aparición secundaria de NVPO en el postoperatorio serían ventajosas en cirugía de mínima estancia hospitalaria, pues permitiría reducir el tiempo de estancia en reanimación y optimizar los costes hospitalarios [11,14]. La adopción de la pauta analgésica multimodal preventiva con ketamina de nuestro estudio, disminuye el consumo de morfínicos postoperatorio sin asociarse a efectos secundarios y permite, como sugieren otros autores [15], controlar con administración de antiinflamatorios no esteroideos el dolor postoperatorio, sin el empleo de anestésicos volátiles.

Conclusión

Utilizada en TIVA durante la cirugía laparoscópica de mínima estancia hospitalaria, la ketamina a dosis subanalgésicas administrada antes de la incisión, y durante el mantenimiento junto con remifentanilo mostró ser eficaz en la disminución del dolor postoperatorio y el consumo de morfínicos en la Unidad de Reanimación. Además, la reducción del consumo de morfínicos se consiguió sin la aparición de los efectos secundarios centrales propios de la ketamina en el postoperatorio. Serían necesarios futuros ensayos clínicos aleatorizados y controlados para comparar la eficacia de la ketamina combinada, o no con agentes anestésicos volátiles.

Bibliografía

1. Albutt C. On the abuse of hypodermic injections of morphia. *Practitioner* 5:327-331, 1870.
2. Angst MS, Clark JD. Opioid-induced hyperalgesia: A qualitative systematic review. *Anesthesiology* 104(3):570-587, 2006.
3. Bell RF, Dahl JB, Moore RA, Kalso E. Peri-operative ketamine for acute post-operative pain: A quantitative and qualitative systematic review (Cochrane review). *Acta Anaesthesiol Scand* 49(10):1405-1428, 2005.
4. Carlton SM, Coggeshall RE. Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. *Brain Res* 820(1):63-70, 1999.
5. Chang G, Chen L, Mao J. Opioid tolerance and hyperalgesia *Med Clin North Am* 91(2):199-211, 2007.
6. Coggeshall RE, Carlton SM. Ultrastructural analysis of NMDA, AMPA, and kainate receptors on unmyelinated and myelinated axons in the periphery. *J Comp Neurol* 391(1): 78-86, 1998.
7. Domino EF, Domino SE, Smith RE, Domino LE, Goulet JR, Domino KE, Zsigmond EK. Ketamine kinetics in unmedicated and diazepam-premedicated subjects. *Clin Pharmacol Ther* 36(5):645-653, 1984.
8. Guignard B, Bossard AE, Coste C, Sessler DI, Lebrault C, Alfonsi P, Fletcher D, Chauvin M. Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanyl increases postoperative pain and morphine requirement. *Anesthesiology* 93(2):409-417, 2000.
9. Hahnenkamp K, Nollet J, Van Aken HK, Buerkle H, Halene T, Schauerte S, Hahnenkamp A, Hollmann MW, Strümper D, Durieux ME, Hoenemann CW. Remifentanyl directly activates human N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Anesthesiology* 100(6):1531-1537, 2004.
10. Himmelseher S, Durieux ME. Revising a dogma: Ketamine for patients with neurological injury? *Anesth Analg* 101(2):524-534, 2005.
11. Hirsch J. Impact of postoperative nausea and vomiting in the surgical setting. *Anaesthesia* 49(Suppl.1):30-33, 1994.
12. Hollmann MW, Liu HT, Hoenemann CW, Liu WH, Durieux ME. Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium. Part II: interactions with volatile anesthetics. *Anesth Analg* 92(5): 1182-1191, 2001.
13. Joly V, Richebe P, Guignard B, Fletcher D, Maurette P, Sessler DI, Chauvin M. Remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia and its prevention with small-dose ketamine. *Anesthesiology* 103(1):147-155, 2005.
14. Kehlet H, Gray AW, Bonnet F, Camu F, Fischer HB, McCloy RF, Neugebauer EA, Puig MM, Rawal N, Simanski CJ. A procedure- specific systematic review and consensus recommendations for postoperative analgesia following laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 19(10): 1396-1415, 2005.
15. Kwok RFK, Lim J, Chan MT, Gin T, Chiu WK. Preoperative ketamine improves post-operative analgesia after gynecologic laparoscopic surgery. *Anesth Analg* 98(4):1044-1049, 2004.

16. Laulin JP, Maurette P, Corcuff JB, Rivat C, Chauvin M, Simonnet G. The role of ketamine in preventing fentanyl-induced hyperalgesia and subsequent acute morphine tolerance. *Anesth Analg* 94(5):1263-1269, 2002.
17. Lee M, Silverman SM, Hansen H, Patel VB, Manchikanti L. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician* 14(2):145-161, 2011.
18. Lentschener C, Axler O, Fernandez H, Megarbane B, Billard V, Fouqueray B, Landault C, Benhamou D. Haemodynamic changes and vasopressin release are not consistently associated with carbon dioxide pneumoperitoneum in humans. *Acta Anaesthesiol Scand* 45(5):527-535, 2001.
19. López-Millán JM, Sánchez-Blanco C. Utilización de ketamina en el tratamiento del dolor agudo y crónico. *Rev Soc Esp Dolor* 14(1):45-65, 2007.
20. Mao J, Price DD, Mayer DJ. Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: A current view of their possible interactions. *Pain* 62(3):259-274, 1995.
21. Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G. Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. *J Neurosci* 22(18):8312-8323, 2002.
22. Mao J. Opioid-induced abnormal pain sensitivity. *Curr Pain Headache Rep* 10(1):67-70, 2006.
23. Mao J. Opioid-induced abnormal pain sensitivity: Implications in clinical opioid therapy. *Pain* 100(3):213-217, 2002.
24. Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(14):7731-7736, 1999.
25. Miller RD. *Miller's Anesthesia*. 6th ed. Philadelphia PA: Elsevier, Churchill, Livingstone, 2005.
26. Morris RW, Ernst E, Greaves DJ, Layfield DJ, Michael RF. An audit of the incidence and costs associated with post-operative nausea and vomiting (PONV) following major gynaecological surgery in an inpatient population. *Br J Anaesth* 70 (Suppl.1):1-A2, 1993.
27. Ossipov MH, Lai J, King T, Vanderah TW, Porreca F. Underlying mechanisms of pronociceptive consequences of prolonged morphine exposure. *Biopolymers* 80(2-3):319-324, 2005.
28. Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: A review. *Anesth Analg* 97(4):1108-1116, 2003.
29. Pöyhä R, Vainio A. Topically administered ketamine reduces capsaicin-evoked mechanical hyperalgesia. *Clin J Pain* 22(1):32-36, 2006.
30. Servin FS, Billard V. Remifentanyl and other opioids. *Handb Exp Pharmacol* (182):283-311, 2008.
31. Silverman SM. Opioid induced hyperalgesia: Clinical implications for the pain practitioner. *Pain Physician* 12(3):679-684, 2009.
32. Subramaniam K, Subramaniam B, Steinbrook RA. Ketamine as adjuvant analgesic to opioids: A quantitative and qualitative systematic review. *Anesth Analg* 99(2):482-495, 2004.

33. Suzuki R, Morcuende S, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH. Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nat Neurosci* 5(12):1319-1326, 2002.
34. Vanderah TW, Ossipov MH, Lai J, Malan TP Jr, Porreca F. Mechanisms of opioid-induced pain and antinociceptive tolerance: descending facilitation and spinal dynorphin. *Pain* 92(1-2):5- 9, 2001.
35. Vera-Portocarrero LP, Zhang ET, King T, Ossipov MH, Vanderah TW, Lai J, Porreca F. Spinal NK-1 receptor expressing neurons mediate opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance via activation of descending pathways. *Pain* 129(1-2):35-45, 2007.
36. Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence *Physiol Rev* 81(1):299-343, 2001.
37. Zakine J, Samarcq D, Lorne E, Moubarak M, Montravers P, Beloucif S, Dupont H. Post-operative ketamine administration decreases morphine consumption in major abdominal surgery: a prospective, randomized, double- blind, controlled study. *Anesth Analg* 106(6):1856-1861, 2008.

ERGmf en pacientes de enfermedades autoinmunes sistémicas tratados con hidroxicloroquina

Sáez-Moreno JA, Ktiri N,
Rodríguez-Ferrer JM

Resumen

Introducción. Los pacientes de enfermedades autoinmunes tratados con hidroxicloroquina tienden a presentar alteraciones retinianas, que pueden deberse a su enfermedad o al tratamiento con dicho fármaco.

Métodos. En el presente estudio, Se ha explorado mediante electrorretinografía multifocal (ERGmf) las retinas de 19 pacientes que toman hidroxicloroquina regularmente como terapia de su enfermedad autoinmune (14 casos de lupus eritematoso sistémico, 3 de conectivopatía indiferenciada, 1 de artritis reumatoide y 1 síndrome de Sjögren) y de 9 personas sanas, que han servido como grupo control.

Resultados. Los ERGmf de los pacientes mostraron registros con morfología anormal, compuestos por múltiples ondas de baja amplitud. En comparación con el grupo control, la densidad eléctrica de los cinco anillos analizados fue significativamente inferior, en un porcentaje que osciló entre el 30% del anillo 5 y el 39% del anillo 2. Según la distribución de la disminución de densidad eléctrica se observaron tres patrones, uno con disminución generalizada en toda la retina estudiada (anillos 1-5), otro con disminución predominante en el área central (anillos 1-2) y un tercero con disminución predominante en la región periférica (anillos 4-5). Los resultados muestran que todos los pacientes estudiados presentan alteraciones electrofisiológicas de la retina externa. De estas alteraciones, destaca la disminución de la densidad eléctrica de las respuestas registradas. El patrón de disminución de la densidad eléctrica más frecuente fue el generalizado (12 pacientes), seguido del central (4 pacientes) y del periférico (3 pacientes).

Conclusión. Estos resultados sugieren que las alteraciones observadas se deben principalmente a la patología de base.

Palabras clave: *Enfermedades autoinmunes sistémicas, Lupus eritematoso, LES, Electrorretinografía multifocal, ERGmf*

Introducción

Las enfermedades autoinmunes sistémicas (EAS) son un grupo de afecciones clínicamente heterogéneo, pero con el denominador común de poseer una base etiopatogénica constituida por alteraciones de naturaleza autoinmune, presentar lesiones, simultáneamente o a lo largo de su evolución, en prácticamente todos los órganos del cuerpo humano y requerir un manejo terapéutico multidisciplinar [1]. Estas características convierten a las enfermedades autoinmunes sistémicas en unas de las patologías de más difícil control médico. A diferencia de enfermedades autoinmunes órgano específicas [2], las EAS se producen cuando los anticuerpos atacan antígenos no específicos en más de un órgano en particular. Las EAS más importantes son el lupus eritematoso sistémico, el síndrome de Sjögren y la artritis reumatoide.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica que afecta al tejido conjuntivo, caracterizada por inflamación y daño de tejidos debido a la unión de anticuerpos a las células del organismo y al depósito de complejos antígeno-anticuerpo [3]. El LES puede afectar cualquier parte del organismo, aunque los sitios más frecuentes son el aparato reproductor, las articulaciones, la piel, los pulmones, los vasos sanguíneos, los riñones, el hígado (el primer órgano que suele atacar) y el sistema nervioso. El curso de la enfermedad es impredecible, con periodos de crisis alternados con remisión. El LES es 9 veces más frecuente en las mujeres y se presenta más comúnmente en asiáticos y africanos. Las primeras manifestaciones de la enfermedad se observan frecuentemente entre los 15 y 44 años de edad [4]. Aunque hasta el momento no hay una cura, los síntomas se tratan principalmente con dosis bajas de corticoesteroides, inmunosupresores y antipalúdicos como la hidroxiquina.

El Síndrome Sjögren se caracteriza por afectar principalmente a las glándulas exocrinas que conduce a la aparición de sequedad [5]. Las glándulas exocrinas, son las encargadas de producir líquidos como la saliva, las lágrimas, las secreciones mucosas de la laringe y de la tráquea y las secreciones vaginales. Líquidos que hidratan, lubrican y suavizan las mucosas del organismo que están en contacto con el exterior. Es también una enfermedad reumática, que produce dolor e hinchazón en las articulaciones. Recibe el nombre en honor al científico sueco Henrik Sjögren. Se reconocen dos formas distintas que sólo se distinguen en función de si la enfermedad está acompañada o no de otras enfermedades autoinmunes: el síndrome de Sjögren primario y el síndrome de Sjögren asociado a otras enfermedades, más conocido como síndrome de Sjögren secundario [6,7]. El primero aparece sin la presencia de otra enfermedad autoinmune asociada. En el segundo, además del Sjögren, el paciente presenta otras enfermedades autoinmunes o reumatológicas como el LES o la artritis reumatoide.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica autoinmune, caracterizada por provocar inflamación crónica principalmente de las articulaciones, que produce destrucción progresiva con distintos grados de deformidad e incapacidad

funcional [8,9]. En ocasiones, su comportamiento es extraarticular pudiendo afectar a diversos órganos y sistemas, como los ojos, pulmones y pleura, corazón y pericardio, piel o vasos sanguíneos [10,11]. Aunque el trastorno es de causa desconocida, la autoinmunidad juega un papel primordial en que sea una enfermedad crónica y en la forma como la enfermedad progresa.

PATOLOGÍAS OCULARES Y RETINIANAS EN LAS EAS

Los pacientes con enfermedades autoinmunes suelen presentar alteraciones oculares. La principal estructura comprometida a nivel ocular es la córnea, pero pueden afectarse también conjuntiva, coroides, esclera y retina [12-14]. La EAS más frecuente en nuestro medio es la AR, en la cual cerca de 25% de los pacientes presentan patología ocular, en especial la queratoconjuntivitis seca o síndrome de ojo seco (11-13%) [15-18]. Otras manifestaciones son: escleritis, epiescleritis, queratitis, úlceras de córnea y con menor frecuencia, coroiditis, vasculitis retiniana, nódulos epiesclerales. Por su parte, el LES compromete el globo ocular en un 20% de los pacientes. Las manifestaciones oculares incluyen: ojo seco, conjuntivitis, uveítis, epiescleritis, escleritis, queratitis y eritema discoide lúpico sobre los párpados, que puede confundirse con blefaritis. El compromiso neuro-oftalmológico en pacientes con lupus eritematoso sistémico puede darse como: neuritis óptica, neuropatía óptica isquémica, defectos campimétricos, oftalmoplejía internuclear, alteraciones de los nervios oculomotores, pseudotumor cerebral y alucinaciones visuales [12,19].

Las alteraciones retinianas en las EAS se deben principalmente a la vasculitis asociada a estas enfermedades del tejido conjuntivo [20, 21]. En la AR, la vasculitis se suele observar en pacientes con 10 o más años de evolución con enfermedad articular severa. Las alteraciones retinianas incluyen edema macular, pseudoexudados cotonosos y desprendimiento de retina. En el LES, las alteraciones retinianas incluyen: pseudoexudados cotonosos, hemorragias superficiales por complicaciones de púrpura trombocitopénica, oclusiones vasculares cuando se asocia el síndrome antifosfolípidos, y cambios de epitelio pigmentario por desprendimiento seroso de retina secundario a coroidopatía vasculítica.

TOXICIDAD RETINIANA CLOROQUÍNICA

La cloroquina y la hidroxicloroquina son compuestos aromáticos del grupo 4-aminoquinolina, substitutos sintéticos de la quinina. El quino sigue siendo la única fuente útil de quinina; se trata de un árbol originario de América, perteneciente al género *Cinchona*, de cuya corteza se extraen diversas sustancias, entre ellas quinina. La diferencia entre cloroquina y la hidroxicloroquina radica en que la segunda se caracteriza por la b-hidroxilación de uno de los substitutos N-etil. Estas drogas fueron utilizadas inicialmente como antimaláricos durante la segunda gue-

rra mundial. En la actualidad, la cloroquina, y sobre todo la hidroxicloroquina, son útiles en el manejo de algunos casos de EAS por sus propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras e inhibidoras de la tendencia trombótica. Fue Payne quien usó por primera vez la quinina en 1894 para tratar el LES, al notar que dosis altas de este fármaco inducían palidez cutánea. En la década de los cincuenta del siglo pasado, se popularizó el uso de los antimaláricos en enfermedades autoinmunes sistémicas. En 1959, Hobbs demostró que el tratamiento prolongado con estas drogas inducía toxicidad retiniana. Dado que la cloroquina altera la barrera hematorretiniana, la toxicidad de esta droga es mayor que la de la hidroxicloroquina [22]. Se estima que la prevalencia de toxicidad por cloroquina en tomadores de antipalúdicos es del 0.1% - 0.5 %. Este porcentaje sube al 1% tras 5 años de tratamiento.

Las alteraciones retinianas inducidas por ambas drogas incluyen alteración de la membrana citoplasmática de las células ganglionares de la retina y procesos degenerativos en el segmento externo de los fotorreceptores (conos y bastones), acúmulo de pigmento subretiniano (fosfolípidos) y disminución de la capa de fibras nerviosas del nervio óptico [23]. Los signos y síntomas más tempranos de retinopatía cloroquinica incluyen escotoma paracentral bilateral, despigmentación granular paracentral del epitelio pigmentario de la retina y alteraciones en la lectura [24]. Con la exposición continua al fármaco, se produce la aparición progresiva de una maculopatía atrófica bilateral en diana (o en ojo de buey) que, en casos graves, se puede extender a todo el fondo de ojo, produciendo una atrofia retiniana generalizada y una gran pérdida de agudeza visual [25]. Dada su afinidad por la melanina, los antipalúdicos se retienen y acumulan en el epitelio pigmentario de la retina. Se ha sugerido que este hecho es el responsable de la retinopatía cloroquinica o de su progresión a pesar de la suspensión del tratamiento [26, 27].

ELECTRORRETINOGRAFÍA MULTIFOCAL

En la actualidad, se propone que la electrorretinografía multifocal (ERGmf) puede aportar datos objetivos útiles para el diagnóstico temprano y seguimiento de las alteraciones retinianas de las EAS y de la toxicidad que la cloroquina e hidroxicloroquina causan en la retina [28]. La ERGmf, desarrollada por Sutter en 1992 [29], mide la respuesta eléctrica local de la capa externa de la retina en distintos puntos simultáneamente. Los datos registrados se analizan mediante un sistema informático que nos aporta una imagen topográfica de la actividad eléctrica de la retina [30]. El estímulo visual usado consiste en una pantalla con 61 ó 103 elementos hexagonales que se alternan de blanco a negro (Fig. 1). La respuesta se recoge mediante un electrodo corneal, que obtiene una respuesta eléctrica para cada punto estimulado. La onda que se obtiene no es una representación directa de la actividad eléctrica retiniana, sino que el sistema informático realiza un análisis matemático de las respuestas eléctricas, dando como resul-

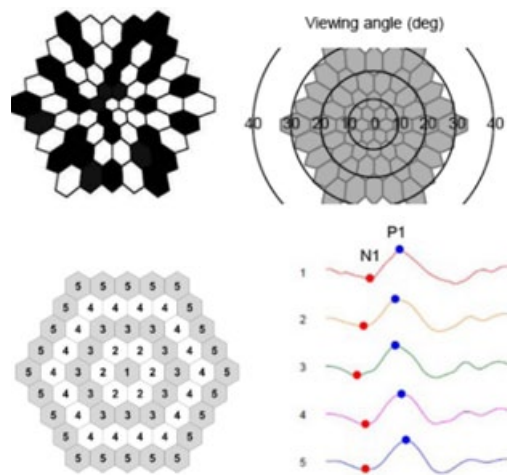


FIGURA 1. Arriba a la izquierda se muestra el estímulo utilizado y que consiste en una matriz de 61 hexágonos, que se alternan del blanco al negro de forma pseudorandomizada. La siguiente imagen muestra el ángulo visual que el estímulo subtende en la retina. Abajo en la tercera imagen se muestra un diagrama de los 61 hexágonos con el número de anillo al que pertenecen. Los anillo se numeran del 1 al 5, desde el central al más periférico. A la derecha se muestra el promedio de las ondas N1 y P1 de cada anillo.

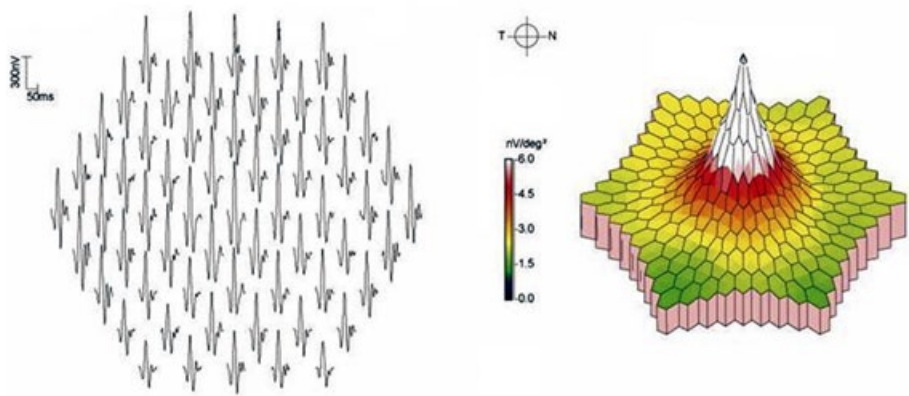


FIGURA 2. ERGmf normal.
En la izquierda se muestran los 61 trazados del registro y a la derecha la representación tridimensional de la densidad eléctrica.

tado una onda con una primera deflexión negativa denominada N1, que se corresponde principalmente con la respuesta de los fotorreceptores y una segunda positiva P1 producida por células bipolares. En sujetos normales la amplitud de las ondas registradas es mayor en la fovea, y decrece conforme aumenta excentricidad [31]. En el análisis de los datos, se establecen de manera estándar cinco anillos concéntricos, del 1, que es el central, al 5, que es el más externo (Fig.1). El programa informático obtiene un topograma con un mapa de ondas (N1-P1) de la retina y una representación tridimensional de la densidad eléctrica de las áreas retinianas estudiadas. (Fig. 2).

El objetivo del presente trabajo ha sido, en primer lugar, estudiar las características de los ERGmfs de pacientes con EAS tratados con hidroxycloroquina y, en segundo lugar, determinar los efectos de la enfermedad y/o del tratamiento en la actividad electrofisiológica de la retina de los mismos.

Sujetos y métodos

Se han estudiado, como grupo control, las retinas de 9 personas sanas y las de 19 pacientes con EAS que están siendo tratados con hidroxycloroquina (Tabla 1).

Todos los pacientes han sido atendidos en el Servicio de Neurofisiología Clínica del Hospital Universitario San Cecilio de Granada (HUSC). El grupo control estuvo compuesto por 3 hombres y 6 mujeres, con una edad media de 45,2 de años y un rango de 29-72 años. En el grupo de pacientes todos fueron mujeres con un rango de 29-63 años y una edad media de 46,2 años, que no fue significativamente diferente del grupo control (t-test; $P=0.859$). De los pacientes estudiados, 14 fueron diagnosticados de LES, 3 de CI, 1 de síndrome de Sjögren y 1 de AR. Los pacientes fueron diagnosticadas por facultativos del Servicio de Enfermedades Sistémicas del HUSC. Todos los participantes en el estudio fueron previamente informados y dieron su conformidad para colaborar en el trabajo.

PROCEDIMIENTO DE ERGMF

La evaluación de la retina mediante ERGmf se realizó en el Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva del Instituto de Neurociencias de la Universidad de Granada. Se utilizó el equipo Diagnosys (Diagnosys LLC, Lowell MA, USA) y se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la International Society for Clinical Electrophysiology of Vision [32].

Los pacientes se sentaron a 33 cm de la pantalla de estimulación. El estímulo utilizado fue una matriz de 61 hexágonos que subtiende 60° en la retina. Los filtros utilizados fueron de 10 Hz y 100 Hz. Los estímulos se proyectaron en un monitor LCD, con una secuencia m de 14 bits a 75 Hz. La cadencia de los estímulos está diseñada de manera que cada hexágono tiene aproximadamente un 50% de

TABLA 1. Datos de los pacientes.

Paciente	Sexo / Edad (a)	Indicación del tratamiento con hidroxicloroquina	Tiempo de tratamiento (años)	Dosis acumulada (gramos)
1	M/29	LES	11	803
2	M/58	LES	8	584
3	M/50	LES	8	365
4	M/59	LES	5	377
5	M/43	LES	4	292
6	M/45	LES	4,2	304
7	M/22	CI	4	292
8	M/62	LES	5	365
9	M/51	LES	20	1460
10	M/63	LES	7	448
11	M/35	LES	6	420
12	M/63	AR	10	1825
13	M/38	LES	16	803
14	M/49	LES	5	389
15	M/31	CI	4	292
16	M/55	LES	3	219
17	M/59	Sjögren	5,5	401
18	M/23	CI	1	105
19	M/43	LES	5	365

LES = lupus eritematoso sistémico; CI = conectivopatía
indiferenciada; AR = artritis reumatoide

probabilidades de ser blanco o negro en cada pantalla. La luminancia de los hexágonos blancos fue de 800 cd/ m², la de los negros 0 cd/m² y la del fondo fue de 400 cd/m². Las señales eléctricas se obtuvieron mediante electrodos corneales de fibra DTL (Diagnosys LLC, Lowell MA, USA) y se amplificaron con una frecuencia de muestreo de 1.200 Hz. La respuesta correspondiente a cada región de la retina se obtuvo mediante un análisis kernel de orden 1 de la relación existente entre la fluctuación del campo eléctrico y los cambios de luminancia de cada hexágono. Esta respuesta consiste principalmente en una onda bifásica con una deflexión negativa inicial denominada N1 (producida por la actividad de los fotorreceptores y células bipolares tipo Off), seguida de un pico positivo denominado P1 (pro-

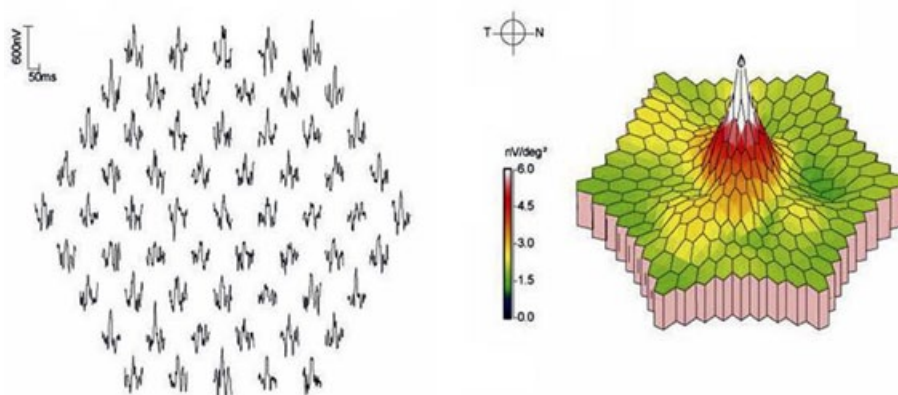


FIGURA 3. Registro ERGmf del ojo derecho de un paciente.

En la izquierda se muestra el topograma de los 61 trazados y a la derecha la representación tridimensional de la densidad eléctrica.

ducida principalmente por las células bipolares tipo On). En los registros ERGmf puede también identificarse un tercer componente que es una onda negativa denominada N2. Esta onda no se ha considerado en nuestro estudio. El análisis de los registros obtenidos se realizó agrupando las 61 respuestas en 5 anillos concéntricos, tal como se muestra en la figura 1. La onda que se obtiene en cada anillo es un promedio de las ondas correspondientes a los hexágonos que lo integran, salvo para el anillo 1, que corresponde a la respuesta del hexágono central. Tanto en el grupo control como en el de pacientes, de cada anillo se midió la latencia (ms) de las ondas N1 y P1, así como la densidad eléctrica medida (nV/deg^2). En la densidad eléctrica de los anillos, la amplitud de la onda P1 es el valor más determinante de las distintas ondas que conforman el registro ERGmf. Mediante el paquete estadístico SPSS se realizó un t-test no apareado.

Resultados

Los ERGmf obtenidos en todos los pacientes se caracterizaron por la presencia de ondas anormales de morfología polifásica y baja amplitud en la mayoría de las 61 áreas retinianas analizadas. Un ejemplo de ERGmf con este tipo de alteraciones obtenido en uno de los pacientes se muestra en la figura 3.

En comparación con el grupo control, los pacientes mostraron un ligero aumento, no significativo, de las amplitudes de las ondas N1 y P1 y un descenso significativo ($P < 0.001$) de la densidad eléctrica en todos los anillos analizados (Fig. 4).

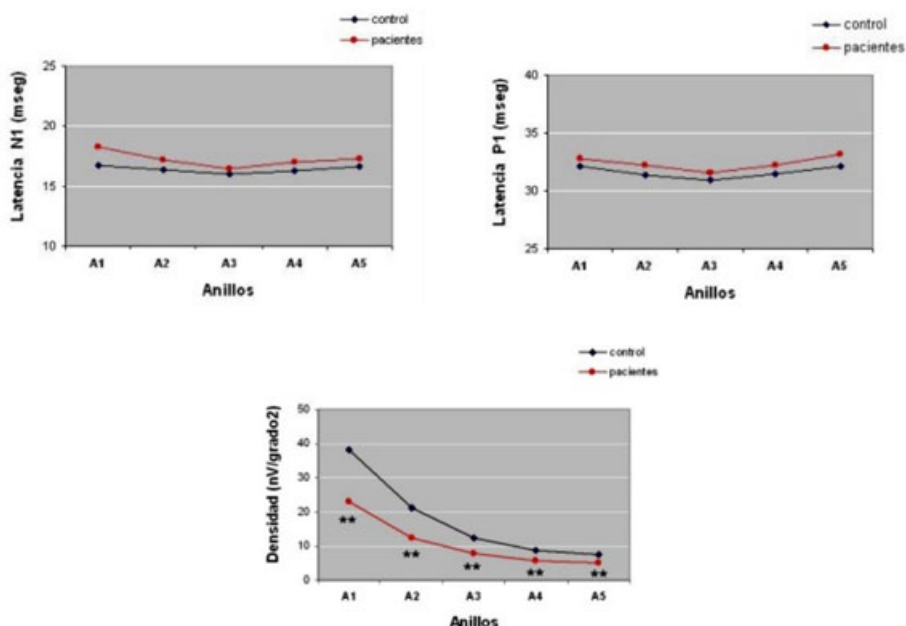


FIGURA 4. Medias de las latencias N1 (Izquierda) y P1 (centro) y de la densidad eléctrica (derecha) de los cinco anillos (A1-A5) obtenidas en el grupo control y en el de pacientes.

** $P < 0.001$ vs control. Para facilitar la claridad de la figura no se han mostrado los errores estándar de las medias.

Los cambios del ERGmf observados en el grupo de pacientes se muestran en porcentaje respecto del grupo control en la figura 5. Como puede observarse, el descenso de la densidad eléctrica varió entre el 39 % en el anillo 2 y el 30 % del anillo 5. En cambio, como se muestra en la figura 5, los cocientes o ratios de densidad entre el anillo central y el resto fueron similares en ambos grupos experimentales.

El análisis individualizado de los 19 pacientes mostró que, en función del porcentaje de disminución de la densidad eléctrica de los distintos anillos, los pacientes se pueden clasificar en tres grupos (Fig. 6).

El primer grupo, formado por 12 pacientes, se caracteriza por una disminución similar en los cinco anillos y que denominamos patrón generalizado. El segundo, formado por 4 pacientes, muestra una disminución mayor en los anillos 1 y 2 (patrón central) y el tercero, de 3 pacientes, presenta una mayor disminución en los anillos 4 y 5 (patrón periférico).

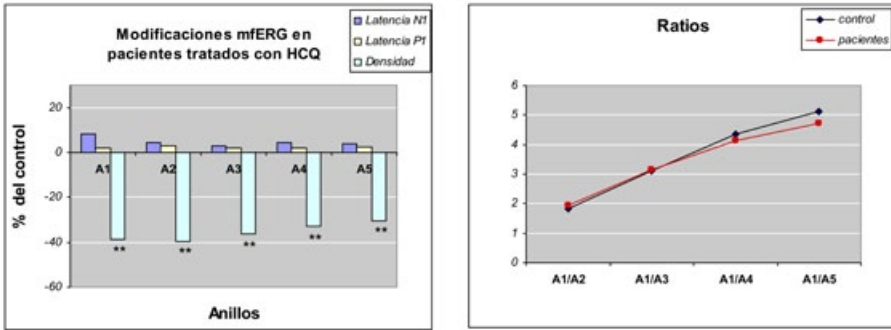


FIGURA 5. A la izquierda se muestra el porcentaje de cambio en los parámetros del ERGmf (latencias N1, P1 y densidad eléctrica) de los pacientes en comparación con el grupo control. Cada barra representa la media de los valores obtenidos.

** $P < 0.001$ vs control. A la derecha se muestran las medias de los ratios obtenidos correspondientes a los grupos control y de pacientes.

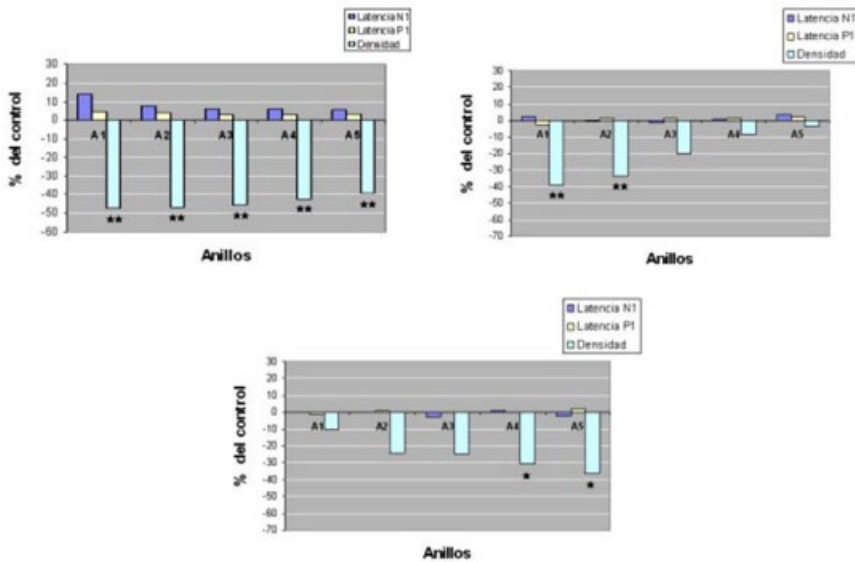


FIGURA 6. Patrones de disminución de densidad obtenidos. Generalizado (izquierda), central (centro) y periférico (derecha).

Cada barra representa la media de los valores obtenidos. * $P < 0.01$ vs control. ** $P < 0.001$ vs control.

Discusión

El ERGmf mide la actividad eléctrica de la retina de manera focalizada, lo que permite detectar defectos en su función no muy extensos y difíciles de valorar con otras técnicas neurofisiológicas [29-32]. Los resultados obtenidos muestran que los pacientes con EAS presentan ERGmfs con latencias aumentadas y disminución en la amplitud de las ondas N1 y P1. Estos resultados coinciden con lo descrito previamente por Lai et al. [33] y Maturi et al. [34]. No obstante, y a diferencia de estos dos estudios, en la mayoría de nuestros pacientes las ondas registradas presentan una morfología polifásica.

En el análisis por anillos, el grupo de pacientes, comparado con el control, mostró un descenso estadísticamente significativo de la densidad eléctrica en los cinco anillos analizados. Este descenso fue similar en los diferentes anillos. Por ello, los cocientes (ratios) entre el anillo central y los restantes fueron similares en ambos grupos experimentales. No obstante, en función del porcentaje de disminución por anillo de la densidad eléctrica, nuestros pacientes se pueden clasificar en tres tipos de patrones de pérdida de densidad. El primer tipo se caracteriza por una disminución similar en todos los anillos y que hemos denominado como patrón generalizado (pacientes 1, 2, 4, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17). El segundo tipo presenta una disminución predominante en los anillos 1 y 2, denominado como patrón central (pacientes 3, 5, 18 y 19). Por último, un tercer tipo donde la disminución afecta principalmente a anillos 4 y 5 y que denominamos como patrón periférico (pacientes 6, 7 y 10). No existe relación entre el tipo de enfermedad autoinmune y el patrón de pérdida mostrado por el ERGmf, ya que los tres tipos de patrones se observaron en los 14 casos de LES y en las 3 CI estudiados. En cambio, y como se muestra en la figura 7, el grupo con patrón generalizado tiene una media de

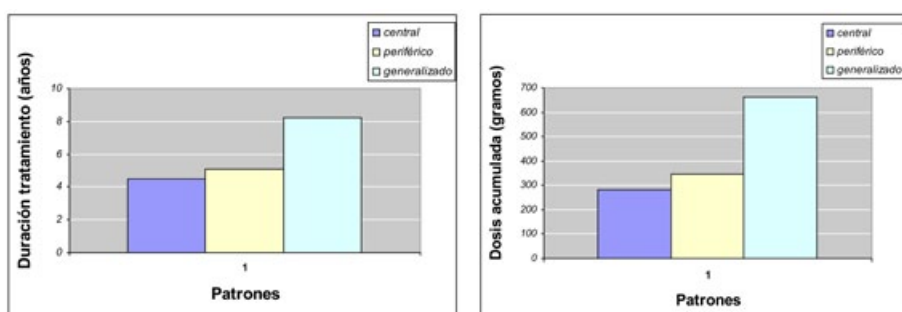


FIGURA 7. Duración del tratamiento (Izquierda) y dosis acumulada (derecha) de hidroxiclороquina de los pacientes con patrón generalizado, central y periférico. Cada barra representa la media de los valores obtenidos.

años de tratamiento (8,2) y gramos (661,5) de dosis acumulada de hidroxiclороquina superior a la del grupo con patrón central (4,5 años y 281,8 gramos) o periférico (5 años y 348 gramos). No obstante, y debido a la dispersión de los datos, estas diferencias no son significativas.

En un grupo de 12 pacientes con EAS tratados con hidroxiclороquina, Lai et al. [33] han mostrado un descenso significativo de las densidades eléctricas del 17 % en los anillos 1 y 2, mientras que en el resto de anillos el descenso fue del 7%. Por otro lado, Moshos et al. [35], en un grupo de 20 pacientes de características similares, han mostrado un descenso de la densidad eléctrica del 30% en el anillo 2 y en cuatro de los pacientes un descenso del 53% en el anillo 1. Recientemente, Raster et al. [36], en un grupo de 24 pacientes, con EAS tratados con hidroxiclороquina, brasileños de origen no caucásico han mostrado un descenso significativo del 17% de la densidad eléctrica sólo en el anillo 2. En el presente trabajo, de los 19 pacientes estudiados, solo cuatro mostraron una disminución predominante de la densidad eléctrica en la retina central (anillos 1 y 2), similar a los mostrados por otros autores [33, 35, 36], mientras que la mayoría, 12 pacientes, mostraron un patrón generalizado con descensos similares en todos los anillos. Esta diferencia puede deberse a la duración del tratamiento y/o a la dosis acumulada de la hidroxiclороquina. Así, en los tres estudios previos la media de los años de tratamiento tuvo un rango de 3-4 años y la dosis acumulada de 302-323 gramos, inferior a los valores que presentan los pacientes con patrón generalizado (8 años de tratamiento y 661 gramos de dosis acumulada). Es interesante destacar que en el grupo con patrón central, la media de los años de tratamiento (4,5 años) y de la dosis acumulada (281,8 gramos) es similar a la mostrada por los estudios mencionados.

En 50 pacientes con EAS, sin patología retiniana asociada y tratados con dosis acumuladas de hidroxiclороquina elevadas (entre 500 y 2500 gramos), Lyons y Severns [37] han mostrado que esta droga induce de manera característica (62% de los pacientes) un descenso de la densidad eléctrica en el anillo 2, que han denominado como patrón de pérdida pericentral y que coincide parcialmente con los mostrados por los estudios precedentes [33, 35, 36]. El resto de los pacientes mostraron un patrón generalizado (22%), periférico (11%) y por último el central (5%) con afectación solo del anillo 1. En conjunto, estos datos sugieren que la hidroxiclороquina induce una alteración del ERGmf que afecta de manera característica a la región pericentral (anillo 2) de la retina. A diferencia de estudios previos [33, 35, 36, 37] que muestran una disminución de la densidad limitada a las áreas central (anillo 1) y/o pericentral (anillo 2) de la retina, y que la atribuyen principalmente a un efecto de la hidroxiclороquina, la mayoría de nuestros pacientes (63%) presentaron un patrón de pérdida generalizado, con disminución de densidad similar en los cinco anillos. Esta diferencia en los patrones de pérdida del ERGmf puede deberse al tipo de pacientes incluidos en los estudios, más que a las dosis acumuladas de hidroxiclороquina. En el caso de los estudios precedentes [33, 35, 36, 37] los pacientes, de manera mayoritaria, no tenían sintomatología vi-

sual, mientras que en nuestro caso la mayoría de los pacientes sí la presentaron. En la mayoría de los casos las alteraciones visuales consistieron en pérdida de la agudeza visual y alteración del test de los colores. Mediante diferentes pruebas electrofisiológicas como el electroretinograma Ganzfeld o los potenciales evocados visuales se pudo determinar que el 58 % de los pacientes estudiados presentaba retinopatía externa, un 16 % neuropatía óptica, tanto axonal como desmielinizante, y un 26 % otras patologías.

El predominio del patrón generalizado, sugiere que las alteraciones del ERGmf encontradas se deben principalmente a los efectos de las enfermedades autoinmunes sobre la retina. En apoyo de esta interpretación cabe indicar que una paciente, diagnosticada de LES y no tratada con hidroxicloroquina, presentó un patrón generalizado en el registro del ERGmf. No obstante, no se puede descartar que, en algunos de los pacientes, las alteraciones del ERGmf estén también producidas por la hidroxicloroquina, especialmente en aquellos pacientes con tratamientos prolongados.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación obtenida de fondos FEDER 2008. UNGR08-1E-011.

Bibliografía

1. Symmons D, Turner C, Webb R, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology* 2002; 41: 793–800.
2. Read RW. Clinical mini-review. Systemic lupus erythematosus and the eye. *Ocul Immunol Inflamm* 2004; 12: 87-99.
3. Karpik AG, Schwartz MM, Dickey LE, Streeten BW, Roberts JL. Ocular immune reactants in patients dying with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1985; 35: 295–312.
4. Sivaraj RR, Durrani OM, Denniston AK, P. I. Murray PI, Gordon C. Ocular manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2007; 46: 1757-1762.
5. Talal N. Síndrome de Sjögren. En Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC, eds. *Cecil Tratado de Medicina Interna*. 19 ed. México DF: Interamericana; 1994. p 1786-1788.
6. Kruszka P, O'Brian RJ. Diagnosis and management of Sjögren syndrome. *Am Fam Physician* 2009; 79: 465-470.
7. Wu AJ. Optimizing dry mouth treatment for individuals with Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 2008; 34: 1001-1010.
8. Stafford-Brady FJ, Urowitz MB, Gladman DD, Easterbrook M. Lupus retinopathy Patterns associations and prognosis *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1105-1110.
9. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; 376: 1094-1108.

10. Wilder RL: Etiologic considerations in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1984; 101: 820-821.
11. Huizinga TW, Pincus T. In the clinic. Rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2010; 153: 42-47.
12. Healey LA, Wilske KR: Evaluating combination drug therapy in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1991; 18: 641-642.
13. Wolfe F. 50 Years of antirheumatic therapy the prognosis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1990; 17: 24-32.
14. Sewell KL, Trentham DE. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1993; 341: 283-286.
15. Matteson EL. Current treatment strategies for rheumatoid arthritis. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 69-74.
16. Leigh JP, Fries JF, Parikh N. Severity of disability and duration of disease in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992; 19: 1906-1911.
17. Hameed K, Gibson T. A comparison of the clinical features of hospital out-patients with rheumatoid disease and osteo- arthritis in Pakistan and England. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 994-999.
18. Suarez-Almazor ME, Soskolne CL, Saunders LD, Russell AS. Outcome in rheumatoid arthritis. A 1985 inception cohort study. *J Rheumatol* 1994; 21: 1438-1446.
19. Petri M, Allbritton J. Hair product use in systemic lupus erythematosus. A case-control study. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 625-629.
20. Love LA. New environmental agents associated with lupus-like disorders. *Lupus* 1994; 3: 467-471.
21. Augusto C. Ocular complications of chloroquine and derivatives therapy. *Arq Bras Oftalmol* 2010; 73: 384-389.
22. Warner A. Early hidroxicloroquine macular toxicity. *Arteritis Rheum* 2001; 44: 1959-1961.
23. Holder, G.D. Electrophysiological assessment of optic nerve disease. *Eye* 2004; 18: 1133-1143.
24. Lai W, Lam B. Cloroquine-induced bull's eye maculopathy. *Hong Kong J* 2005; 11: 55-57.
25. Hochberg MC, Flosheim F, Scott J, Arnett J. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus. *Am J Epidemiol* 1985; 122: 959-966.
26. Tsakonas E, Joseph L, Esdaile JM, Choquette D, Senécal JL, Cividino A et al. A long-term study of hydroxychloroquine withdrawal on exacerbations in systemic lupus erythematosus. The Canadian Hydroxychloroquine Study Group. *Lupus* 1998; 7: 80-85.
27. Bernstein HN. Ocular safety of hydroxychloroquine. *Ann Ophthalmol* 1991; 23: 292-296.
28. Marmor MF, Kellner U, Lai TY, Lyons JS, Mieler WF, American Academy of Ophthalmology Revised recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy. *Ophthalmology* 2011; 118: 415-422.
29. Sutter, E.E.; Tran, D. The field topography of ERG components in man--I. The photopic luminance response. *Vision Res* 1992; 32: 433-436.
30. Hood, D.C.; Odel, J.G.; Chen, C.S.; Winn, B.J. The Multifocal Electrorretinogram. *J Neuro-Ophthalmol* 2003; 23: 225-235.

31. Nagatomo A, Nao-i N, Maruiwa F, Arai M, Sawada M. Multifocal electroretinograms in normal subjects. *Jpn J Ophthalmol* 1998; 42:129-135.
32. Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS et al. ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (ERGmf). (2011 edition) *Doc Ophthalmol* 2012; 124: 1–13.
33. Lai TY, Chan WM, Li H, Lai RY, Lam DS Multifocal electroretinographic changes in patients receiving hydroxychloroquine therapy. *Am J Ophthalmol* 2005; 140: 794–807.
34. Maturi RK, Folk JC, Nichols B, Oetting TT, Kardon RH. Hydroxychloroquine retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1999; 117: 1262–1263.
35. Moschos MN, Moschos MM, Apostolopoulos M, et al. Assessing hydroxychloroquine toxicity by the multifocal ERG. *Doc Ophthalmol* 2004; 108: 47–53.
36. Raster M,F. Horn F, A. Junemann A, et al. Retinal disorders in northern Brazilian patients treated with chloroquine assessed by multifocal ERG. *Doc Ophthalmol* 2011; 122: 77-86.
37. Lyons JS, Severns ML. Detection of early hydroxychloroquine retinal toxicity enhanced by ring ratio analysis of multifocal electroretinography. *Am J Ophthalmol* 2007; 143: 801-809.



Tratamiento de la espasticidad en la parálisis cerebral infantil

Ibáñez-Martínez S, Rodríguez-Ferrer JM.

Resumen

La parálisis cerebral infantil (PCI) refiere un grupo de síndromes neurológicos no progresivos que cursan con deterioro de la postura y el movimiento, ocasionados por una alteración en el desarrollo del sistema nervioso central, que puede ocurrir intraútero, durante el parto o en los dos primeros años de vida. La PCI afecta especialmente a los sistemas centrales motores. En su cuadro clínico resalta de manera especial la espasticidad, que es un tipo de hipertonía inducida de manera refleja. El tratamiento de la espasticidad, es clave en el manejo de los pacientes con PCI ya que condiciona de manera determinante la aplicación de técnicas de rehabilitación motora. En la PCI el tratamiento más utilizado en los últimos 10 años es la inyección de toxina botulínica tipo A (TBA). El tratamiento con TBA siempre debe ser seguido de un tratamiento fisioterápico, de los que el denominado tratamiento del neurodesarrollo muestra los mejores resultados. En algunos casos el tratamiento implica farmacología asociada, especialmente las bombas de baclofeno.

Palabras clave: *Espasticidad, fisioterapia, parálisis cerebral infantil, toxina botulínica, TBA.*

Parálisis cerebral infantil

La parálisis cerebral infantil (PCI) es el término empleado para definir un grupo de síndromes no progresivos que cursan con deterioro de la postura y el movimiento, ocasionados por una alteración en el desarrollo del sistema nervioso central, en especial a parte de sus componentes motores (Fig. 1), que puede ocurrir intraútero, durante el parto o en los dos primeros años de vida. [38]. La PCI es la causa más común de discapacidad física en la infancia, con una prevalencia de 2,4 por cada 1.000 niños de 3 a 10 años [33]. La PCI altera gravemente las actividades funcionales de los pacientes afectando su calidad de vida y la de sus cuidadores, por lo que representa además un importante problema social. Se ha estimado que en 2002 el coste de los cuidados de estos pacientes en Estados Unidos fue de 8.200 millones de dólares [27]. En la PCI, la limitación de la marcha es el problema más común y afecta sobre todo a la velocidad y la resistencia de la misma [31]. Además, están disminuidas la longitud del paso y la cadencia junto a otras anomalías

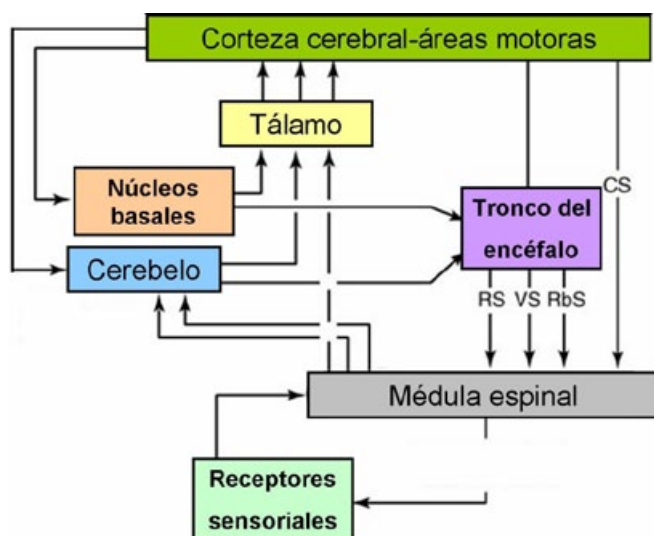


FIGURA 1. Componentes centrales del sistema motor.

CS: haz corticoespinal.

RS: haces retículoespinales.

VS: haces vestibuloespinales.

RbS: haz rubroespinal.

dades en el control muscular. La marcha es importante en el desarrollo óseo y en la resistencia cardiopulmonar y permite una mayor adaptación a actividades de la vida diaria e integración social. Por ello, la rehabilitación y el entrenamiento de la locomoción es el objetivo funcional común en la terapia de estos niños.

ESPASTICIDAD

La hipertonía muscular es una patología frecuente en muchas enfermedades neurológicas. La PCI presenta un tipo de hipertonía inducida de manera refleja y que se denomina espasticidad. Este término hace referencia a un cuadro clínico que se caracteriza por: 1) hipertonía muscular, 2) resistencia creciente al desplazamiento pasivo de una extremidad alrededor de una articulación con fenómenos en «*navaja de muelle*» y «*clonus*» y 3) reflejos tendinosos hiperexcitables [11]. La espasticidad forma parte del síndrome de motoneurona superior [29, 32]. Este síndrome se caracteriza por la presencia de fenómenos clínicos positivos (hiperreflexia, clonías, espasticidad) y negativos (parálisis, pérdida de control

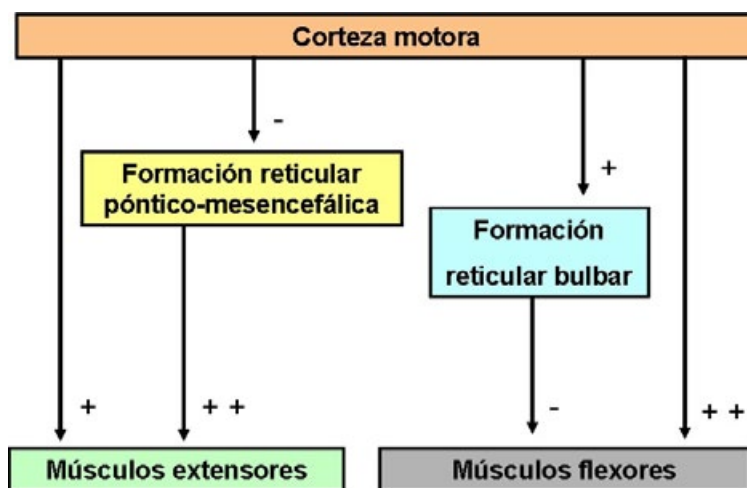


FIGURA 2. Actividad cortical sobre las dos formaciones reticulares y de éstas sobre la musculatura.

(+): activación.

(-): inhibición.

motor). En el ámbito clínico se tiende a considerar la espasticidad como el conjunto de todos los síntomas positivos del síndrome de la motoneurona superior [5]. En los pacientes con CPI espásticos se observa además la presencia de reflejos de liberación piramidal y/o automatismo medular, así como un predominio en músculos antigravitatorios.

La espasticidad se debe a la hiperactividad del sistema de motoneuronas gamma, que controla la excitabilidad del huso muscular y por lo tanto el tono muscular [24]. En el tronco del encéfalo, la formación reticular pónico-mesencefálica o pontina tiene una acción excitadora sobre las motoneuronas gamma, mientras que la formación reticular bulbar tiene una actividad inhibitoria (Figura 2). Estructuras motoras superiores, como la corteza motora, inhiben a la formación reticular pontina y activan a la formación reticular bulbar. Cuando la actividad cortical motora está impedida, bien por lesión de la propia corteza o de la vía piramidal, la actividad de ambas formaciones reticulares se ven liberadas y sobre las motoneuronas gamma predomina la acción excitadora de la formación reticular pontina, especialmente las correspondientes a la musculatura extensora. Esta sobreactivación de las motoneuronas gamma aumenta la actividad de los husos musculares y mediante las fibras la excitan a las motoneuronas alfa y producen la contracción de los músculos correspondientes. Cambios en la actividad neural de base de las motoneuronas

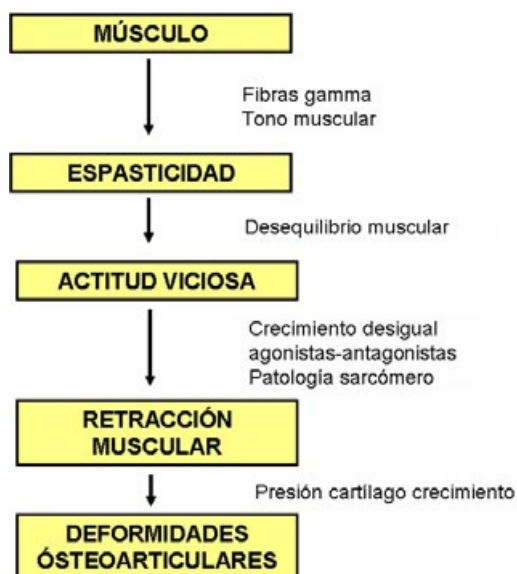


FIGURA 1. Fases evolutivas de la espasticidad en la PCI

alfa y en las aferencias que provienen de las interneuronas pueden también influir en la fisiopatología de la espasticidad [22]. La espasticidad se observa en el 70%-80% de los niños con parálisis cerebral. En España se estima que la espasticidad afecta a 70.000-80.000 nacidos vivos con PCI, con una prevalencia de 2/1.000 [20].

En la PCI, la espasticidad conlleva problemas asociados como el desarrollo de posturas anómalas, dolor, alteraciones estéticas y de higiene. Además, puede llegar a ser incapacitante debido a la fatiga asociada, las caídas y su repercusión en la vida diaria [8]. No obstante, en la mayoría de los casos los músculos tienen tonicidad necesaria para la bipedestación, los cambios posturales y la marcha [41]. La evolución natural de la espasticidad es hacia la cronicidad y en ella se producen fibrosis musculares y de las estructuras adyacentes, con la consecuencia de que la contractura se hace fija y aparecen retracciones y deformidades osteoarticulares.

FASES EVOLUTIVAS DE LA ESPASTICIDAD EN LA PARÁLISIS CEREBRAL

En la evolución de la espasticidad en la PCI se describen cuatro fases bien definidas, que van a determinar el tratamiento (Fig. 3). La primera fase, llamada de *espasticidad*, se caracteriza principalmente por el aumento del tono muscular debido,

como se ha comentado anteriormente, a la hiperexcitabilidad de los musculares de estiramiento. En la segunda fase, o de *actitud viciosa*, se observa un desequilibrio muscular por predominio de la espasticidad en determinados grupos musculares, siendo clásico el predominio de los flexores plantares y varizantes del pie, de los aductores y flexores en la cadera y de los flexores de codo, muñeca y dedos en la extremidad superior [41]. La tercera fase o de *retracción muscular* se caracteriza por la persistencia de esta actitud viciosa. Se produce un crecimiento desigual entre grupos musculares agonistas y antagonistas que conduce a la estructuración de esta actitud, por la falta de acomodación del sarcómero, que es incapaz de conseguir el crecimiento muscular normal. Se entiende como retracción muscular la resistencia opuesta por el músculo a la movilización cuando no está en contracción [23]. La cuarta fase o de *deformidades osteoarticulares*, en el caso de niños en fase de crecimiento, consecutivamente a todas las fases anteriores, se modifican las presiones y los estímulos de tracción del cartílago de crecimiento. Según la clásica, y todavía vigente, *ley de Delpech* [37], ello da lugar a deformidades osteoarticulares, que conllevan el fracaso del tratamiento de la espasticidad en las fases anteriores [16, 30].

Para valorar y cuantificar la espasticidad se utilizan métodos clínicos, biomecánicos y neurofisiológicos y como valoración del estado motor de los pacientes se utiliza el sistema de clasificación de la función motora general, o *Gross Motor Function Classification System* (GMFCS) en inglés. La GMFCS utiliza cinco niveles (I-V) basados en el movimiento auto-iniciado por el paciente con énfasis en la sedestación (control del tronco), las transferencias y la movilidad. En el nivel I el niño camina sin restricciones, en el nivel II camina con limitaciones. En el nivel III camina utilizando un dispositivo manual auxiliar de la marcha. Para considerarse el nivel IV el niño tiene que tener una automovilidad limitada y es posible que utilice movilidad motorizada. En el nivel V es transportado en silla de ruedas [34]. Para definir el sistema de clasificación de cinco niveles, el principal criterio es que la diferencia entre cada uno de estos niveles sea significativo para la vida diaria. Estas diferencias se basan en las limitaciones funcionales, la necesidad de uso de dispositivos auxiliares de la marcha (muletas, bastones, andadores) o de movilidad sobre ruedas (sillas de ruedas manuales o eléctricas, autopropulsadas o no) más que en la calidad del movimiento. Las diferencias entre los niveles I y II no son tan marcadas como entre los otros niveles, particularmente para los niños menores de 2 años.

Tratamiento de la espasticidad en la PCI

TRATAMIENTO CON TOXINA BOTULÍNICA

El tratamiento más utilizado en la actualidad es la inyección de toxina botulínica. Esta toxina actúa bloqueando la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular y produce, por tanto, una denervación química transitoria y la relajación de

la musculatura afectada [21,45]. Dado que también inhibe la liberación periférica de neurotransmisores nociceptivos, tiene además una acción analgésica. De los siete serotipos existentes, el serotipo A es el más conocido y utilizado [10,15,42]. El efecto se inicia progresivamente a los 2 o 3 días, hasta alcanzar su máximo al mes. Mantiene su duración hasta los 3- 4 meses. El grado y duración de la relajación muscular obtenida es dependiente de la dosis. La TBA está formada por dos cadenas, una ligera y una pesada ligadas por un puente disulfuro [7]. La cadena pesada actúa mediante su unión a receptores específicos en la membrana presináptica de la neurona colinérgica. Una vez ligada, la TBA penetra en la neurona mediante endosomas, donde la cadena ligera se libera para poder así acceder al citosol y llevar a cabo su actividad enzimática. La cadena ligera desacopla el mecanismo de liberación de acetilcolina al fragmentar la proteína SNAP-25 que sirve de 'punto de ataque' a la vesícula de acetilcolina [14]. Sin ella, la vesícula no puede fusionarse con la membrana presináptica ni liberar su carga. Fisiológicamente, la TBA produce una denervación y, en consecuencia, una atrofia muscular sin causar fibrosis [13]. No obstante, con el paso del tiempo el axón se regenera y emite nuevas prolongaciones que vuelven a inervar la fibra muscular. Finalmente, la actividad vesicular se reinstaura en las terminales nerviosas originales, las nuevas prolongaciones desaparecen y la placa neuromuscular original recupera su funcionalidad.

En una revisión realizada por la Oficina Canadiense de Coordinación para la Evaluación de Tecnologías para la Salud, se concluyó que el tratamiento con TBA disminuye el tono muscular en pacientes con ictus, parálisis cerebral y esclerosis múltiple [19]. Además, la TBA incrementa el rango articular y mejora la marcha y la funcionalidad [17]. El subcomité de Evaluación de las Tecnologías y las Terapias de la Academia Americana de Neurología recomendó la TBA en el tratamiento del tono y la función pasiva en la espasticidad del adulto y del niño, tanto en miembros inferiores como superiores [39]. Los resultados de la TBA se ven influidos por varios factores, algunos de ellos unidos a la propia técnica de infiltración, a la selección y localización del músculo, a cambios estructurales en el músculo y, en raras ocasiones, al desarrollo de anticuerpos contra la TBA. La TBA proporciona resultados favorables si los factores anteriormente mencionados han sido positivos. Así, niños con una GMFCS de V, (niños que van en sillas de ruedas) o de IV (que tienen una automovilidad limitada) obtienen unos resultados de gran mejora tras la inyección de TBA y que en la escala GMFCS se refleja por el paso a un nivel inferior.

En niños, la dosis utilizada habitualmente es de 1-4 U/kg, en función del grado de espasticidad y del tamaño del músculo a tratar. Se ha comprobado que la dilución mejora los resultados obtenidos con TBA. Se recomienda aumentar la dilución al incrementarse el tamaño del músculo. Las diluciones más usadas son en 1,2 o 4 mL de suero fisiológico [3]. La inyección de TBA es bien tolerada y segura. Comparada con un placebo, la toxina mejora la espasticidad [28]. Las técnicas de localización del músculo a infiltrar son importantes ya que es

recomendable que la inyección se realice lo más cerca posible de la placa motora. Las técnicas más comunes son: 1) la palpación y localización anatómica, 2) la electromiografía, que se utiliza cuando se requiere la localización de músculos pequeños o profundos, 3) la electroestimulación, aconsejable también para músculos pequeños y profundos y 4) la ecografía [3,44]. El control del paciente debe realizarse de forma sistematizada. Se recomienda una valoración a las 2-3 semanas de la aplicación de la TBA y posteriores controles cada 2-3 meses. El efecto de la terapia con TBA se observa a las 8-12 semanas [4,9,26]. La TBA presenta unas contraindicaciones absolutas y relativas. Las absolutas son alergia al medicamento, infección sistémica o en el sitio de inyección, embarazo y lactancia. Las relativas son la existencia de patología neuromuscular asociada, una coagulopatía absoluta y el uso de aminoglucósidos. Las limitaciones al uso de la toxina en el tratamiento de la espasticidad son la inestabilidad médica del paciente, no tener asegurado un programa de rehabilitación integral, posterior a la aplicación, la presencia de contracturas fijas, falta de cooperación del paciente, la presencia de anticuerpos antitoxina botulínica y el uso de anticoagulantes. En una revisión de 19 estudios se muestra la eficacia de la TBA respecto al alivio del dolor, la comodidad del niño, mejora de la atención debido al alivio de dolor y en las habilidades motoras de estos niños con parálisis cerebral en niveles GMFCS IV y V [35].

TRATAMIENTO FISIOTERÁPICO Y REHABILITADOR

El tratamiento fisioterápico y rehabilitador es fundamental en el abordaje de la espasticidad tanto focal como generalizada, desde su inicio y durante todas las etapas evolutivas y acompaña siempre al tratamiento con TBA [3]. De hecho hay estudios que muestran que en caso de no acompañar a la inyección de TBA, esta puede no dar resultado [1]. Las técnicas de fisioterapia más usadas son crioterapia en la musculatura espástica, estiramientos de dicha musculatura, trabajo de la musculatura antagonista, movilizaciones articulares, electroestimulación, trabajo de la musculatura cervical y del tronco, tratamiento postural encefálico, del tronco y extremidades superiores, técnicas de facilitación neuromuscular, de neurorrehabilitación, reeducación del equilibrio y propiocepción, reeducación del patrón de la marcha y terapia ocupacional. En el tratamiento rehabilitador también se usan férulas, órtesis, adaptaciones, yesos, ayudas técnicas y adaptaciones en el domicilio [20]. Las sesiones de tratamiento fisioterápico en el niño a diferencia del adulto son diarias tras los dos primeros meses tras la aplicación de la TBA; en días alternos el tercer y cuarto mes y posteriormente dos días a la semana de forma continuada. Dichas sesiones de fisioterapia son más eficaces si se realizan de forma individualizada para cada niño. En el tratamiento fisioterápico tras la administración de TBA la educación de la fuerza de los músculos inyectados es especialmente adecuada para la reducción de la espasticidad. [43].

Frente a los métodos fisioterápicos clásicos o convencionales que utilizan técnicas como el estiramiento muscular, estiramiento manual y masaje, se viene desarrollando en los últimos años una nueva aproximación metodológica donde se utilizan estrategias más complejas de aprendizaje motor basado en teorías del tratamiento del neurodesarrollo (NDT). La NDT es una aproximación multidisciplinar que contempla los aspectos de evaluación, tratamiento y manejo de los pacientes con CPI [36]. La NDT se centra en cambios sensorio-motores, de percepción y cognitivos, así como sobre el tono muscular y los patrones de movimiento resultantes de una lesión del sistema nervioso central. Uno de los aspectos más distintivos de la NDT es la aplicación de técnicas de estiramiento activo de los músculos con objeto de centrar la acción terapéutica en el desarrollo motor y de las funciones sensorio-motoras y cognitivas. En un estudio reciente, se ha mostrado un mejor resultado de la NDT frente a la fisioterapia clásica [12]. El estudio se llevó a cabo en 76 niños, con edades comprendidas entre 4 y 18 años y con una media de 7 años y 7 meses. Todos los niños recibieron inyecciones de TBA en 2-5 músculos (gastronemio, psoas, isquiotibiales, adductores, sóleo y/o tibial posterior) 4 meses antes de la intervención fisioterápica. A la mitad de los niños se aplicó la NDT y a la otra mitad fisioterapia convencional. Los resultados mostraron de manera significativa mejores valores en la escala GMFCS en el grupo de NDT.

La estimulación eléctrica funcional (FES) es una técnica fisioterápica que también se utiliza en combinación con la TBA en niños con PCI, especialmente con afectación de las extremidades inferiores [20]. Mediante electrodos se superficie, se aplican corrientes eléctricas programadas en fases mientras que los pacientes se someten a un entrenamiento de la marcha asistida en el lado afectado. El entrenamiento consiste en caminar descalzo en una pasarela de 6 m instrumentada con 3 placas de fuerza. Tras diversas sesiones, habitualmente dos series de diez ensayos, se evalúa el ángulo de tobillo durante el ciclo de paso. Un cambio hacia la flexión dorsal del tobillo, indicado por un ángulo de tobillo positivo, al final de la fase de oscilación después de la terapia con TBA o FES o su combinación ayuda a determinar su efecto positivo sobre el patrón de marcha. Recientes estudios [18] han mostrado los efectos positivos de la combinación de la terapias TBA y FES en niños con parálisis cerebral en equinos dinámicos, tales como: mejor posicionamiento previo de pie en el contacto inicial, aumento general en el ángulo de tobillo en el extremo de la fase de oscilación, mejor patrón de contacto del pie y aumento en la frecuencia de choque del talón. Así como reducción del dolor y mantenimiento de la integridad de la cadera.

TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

En determinados casos, el tratamiento farmacológico acompaña a la inyección de TBA y al fisioterápico y rehabilitador. Son tratamientos complementarios que tienden a reducir los espasmos musculares [6]. Se utilizan: baclofeno, diazepam,

dantroleno, tizanidina, clonidina, clorpromazina, fenitoína y carbamazepina. De estos fármacos, el baclofeno es el más utilizado en el tratamiento de la espasticidad en la PCI. El baclofeno es un agonista del ácido gammaminobutírico (GABA) y también interfiere en la liberación de neurotransmisores excitatorios. La dosis inicial es de 5 mg tres veces al día, incrementándose en 5 mg cada tres días hasta alcanzar una dosis máxima de 80 mg al día en varias dosis [10]. Los efectos adversos consisten en alteraciones del ánimo, alucinaciones, síntomas gastrointestinales, hipotensión, alteraciones de la acomodación y de la función oculomotora y deterioro del control de las crisis comiciales. Debe administrarse con precaución si existen trastornos renales y evitar la retirada del fármaco. En estudios recientes, el baclofeno se ha administrado mediante una bomba paraespinal subfascial intratecal con excelentes resultados a corto plazo. [2]. El diazepam facilita la inhibición pre y postsináptica mediada por GABA. La dosis inicial es de 2 mg dos veces al día, incrementándose lentamente hasta un máximo de 60 mg al día en varias dosis. El dantroleno interfiere en el acoplamiento excitación-contracción mediante la disminución de la liberación de calcio en el retículo sarcoplásmico. Se comienza con una dosis de 25 mg al día y se incrementa en 25 mg cada 3-4 días hasta una dosis máxima de 100 mg al día. [10]. La tizanidina, que se une a los receptores adrenérgicos, reduce el flujo simpático inhibiendo los impulsos aferentes hacia el arco reflejo medular. Inhibe por lo tanto la excitación en la médula y a nivel supraespinal. Se comienza con 2 mg dos veces al día y aumentando hasta 8 mg tres veces al día. Suele tolerarse bien, pero puede causar fatiga o sedación [10]. La clonidina tiene efectos similares a la tizanidina y la dosis es de 0,2 a 1 mg al día. La clorpromazina causa bloqueo adrenérgico y se ha utilizado para reducir la espasticidad. Aunque la sedación y el riesgo de discinesia tardía han limitado su uso. La pauta de dosis es 25-75 mg al día. La fenitoína (100-400 mg al día) y la carbamazepina (600-1.200 mg al día) actúan sobre el aferente del huso muscular disminuyendo las descargas espontáneas y las desencadenadas por el estiramiento [10].

Conclusiones

El tratamiento de la espasticidad en la PCI más utilizado en los últimos 10 años es la inyección de toxina botulínica tipo A. El tratamiento con TBA siempre debe ser seguido de un tratamiento fisioterápico. De los diversos tratamientos fisioterápicos utilizados el NDT parece mostrar mejores resultados. En algunos casos, el tratamiento implica farmacología asociada, en especial las bombas de baclofeno. Finalmente, el tratamiento de la espasticidad en niños con PCI debe hacerse de manera multidisciplinar y con la aplicación de al menos dos de las estrategias terapéuticas comentadas.

Bibliografía

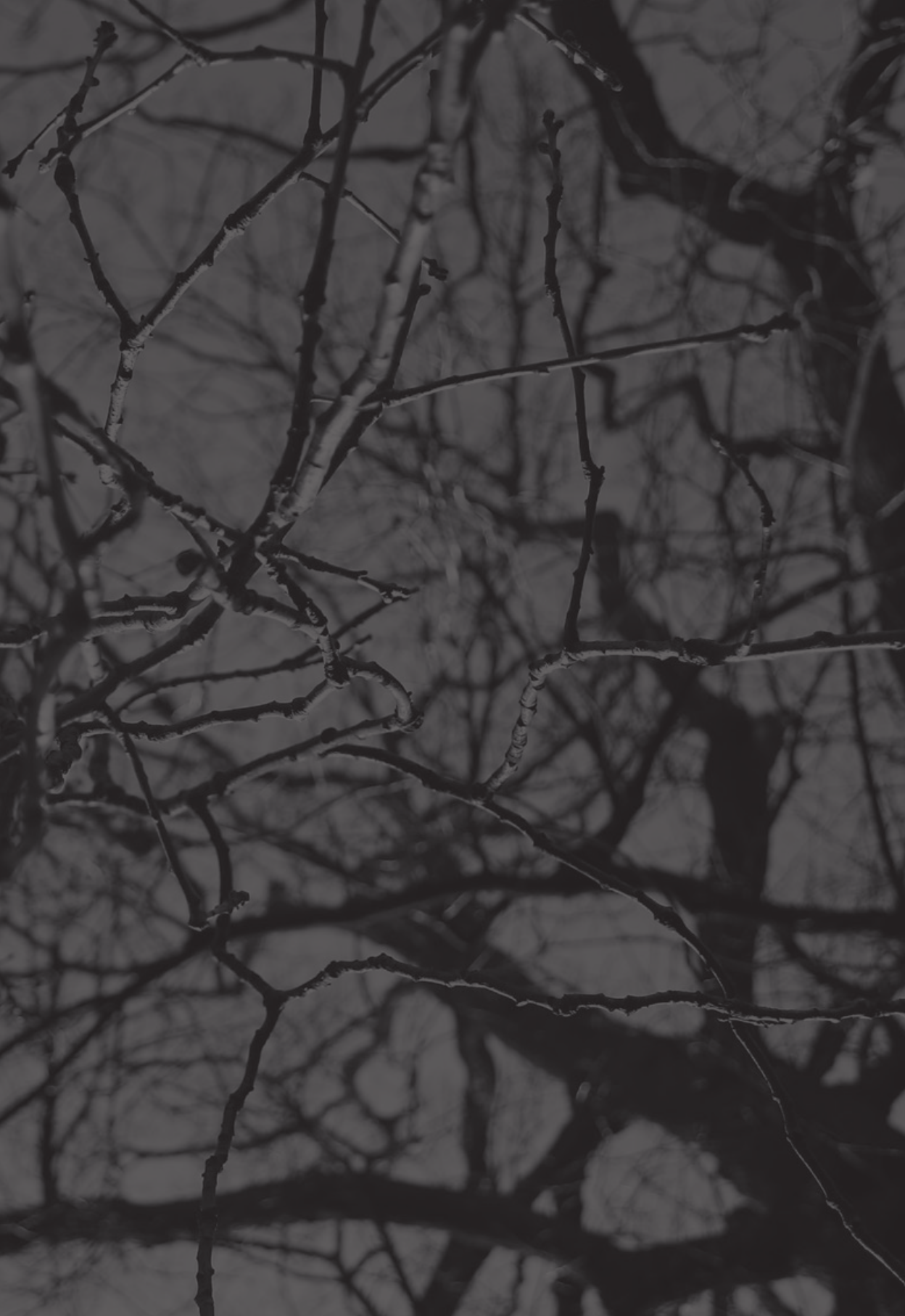
1. Alhusaini A, Crosbie J, Shepher R, et al. No change in calf muscle passive stiffness after botulinum toxin injection in children with cerebral palsy. *Developmental medicine and child neurology*. 2011; 53: 553–558.
2. Bassani L, Harter D.H. Paraspinal subfascial placement of lumbar intrathecal baclofen catheters: short-term outcomes of a novel technique 2012; 9: 93-98.
3. Brashear A, Mayer NH, eds Spasticity and other forms of muscle overactivity in the upper motor neuron syndrome. New York: We move; 2008.
4. Boyd RN, Hays RM. Current evidence for the use of Botulinum toxin type A in the management of children with cerebral palsy: a systematic review, *European Journal of Neurology* 2001; 8: 1–20.
5. Burridge JH, Wood DE, Hermens HJ, et al. Theoretical and methodological considerations in the measurement of spasticity. *Disabil Rehabil* 2005; 27: 69-80.
6. Brin MF. Spasticity: etiology, evaluation, management and the role of botulinum toxin type A. *Muscle Nerve* 1997; 20 (suppl 6): S146-68
7. Brin MF, Aoki KR. Botulinum toxin type A: Pharmacology. In Mayer NH, Simpson DM, eds. Spasticity: etiology, evaluation, management and the role of botulinum toxin. New York: We Move; 2002. p. 110-124.
8. British Society of Rehabilitation Medicine, Chartered Society of Physiotherapy, Association of Chartered Physiotherapists Interested in Neurology. Spasticity in adults: management using botulinim toxin. National guidelines. London: RCP; 2009.
9. Corry IS, Cosgrove AP, Duffy CM, et al. Botulinum toxin A in hamstring spasticity, *Gait and Posture* 1999; 10: 206–210.
10. Chung CY, Chen CL, Wong A. Pharmacotherapy of Spasticity in Children With Cerebral Palsy. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2011; 110:215-222.
11. Delgado JM. Aspectos motores del tronco del encéfalo y del cerebelo. En Manuel de Neurociencia, Delgado JM, Ferrus A, Mora F. Rubia F. eds. Síntesis; 1998; 694-713.
12. Desloovere K, De Cat J, Molenaers G, et al. The effect of different physiotherapy interventions in post-BTX-A treatment of children with cerebral palsy. *European Journal of Pediatric Neurology* 2012; 16: 20-28.
13. De Pavia A, Meunier FA, Molgo J, et al. Functional repair of motor endplates alter botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3200-3205.
14. Dolly JO, Aoki KR. The structure and mode of action of different botulism toxins. *Eur J Neurol Suppl* 2006; 4: 1-9.
15. Duarte E, Alonso B, Fernández MJ, et al. Rehabilitación del ictus: modelo asistencial. Recomendaciones de la Sociedad Española de Rehabilitación y Medicina Física, 2009. *Rehabilitación* 2010; 44: 60-68.
16. Emery D, Wedge J. Orthopaedic management of children with total body involvement cerebral palsy. Mini symposium: cerebral palsy. *Curr Orthop* 2003; 17: 81-87.
17. Esquenazi A, Mayer N, Garreta R. Influence of treatment for elbow flexor spasticity on hemiparetic gait. *Am J Phys Med Rehabil* 2008; 8: 7305-7310.

18. Galena S, Wigginsb L, McWilliamc R et al. Combination of Botulinum Toxin A therapy and Functional Electrical Stimulation in children with cerebral palsy – A pilot study. *Technology and Health Care* 2012; 20: 1–9
19. Garces K, McCormick A, McGahan L, et al. Botulinum toxin A the treatment of upper and lower limb spasticity: a systematic review of randomized controlled trials. Ottawa: Canadian Coordinating Office for Health Technology Assessment (CCOHTA); 2006.
20. Garreta-Figuera R, Chaler-Vilaseca J, Torrequebrada-Giménez A. Guía de práctica clínica del tratamiento de la espasticidad con toxina botulínica. *Rev Neurol* 2010; 50: 685-699.
21. Gracies JM. Pathophysiology of spastic paresis. I: paresis and soft tissue changes. *Muscle Nerve* 2005; 31: 535-551.
22. Heckman CJ, Mottram CJ, Quinlan K, et al. Motoneuron excitability: the importance of neuromodulatory inputs. *Clin Neurophysiol* 2009; 120: 2040-2054.
23. Herring J. Disorders of the brain. In Herring J, ed. *Tachdjian's pediatric orthopaedics*. Chicago: Saunders; 2002. p. 1122-1242.
24. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, et al. *Principles of neural science*. 5ª ed. McGraw Hill. 2013; pp, 790-811.
25. Katusic A, Alimovic S, Mejaski-Bosnjak W. The effect of vibration therapy on spasticity and motor function in children with cerebral palsy: a randomized controlled trial. *Neurorehabilitation* 2013; 32: 1-8
26. Koman LA, Mooney LF, Smith BP et al. Botulinum toxin type A neuromuscular blockade in the treatment of lower extremity spasticity in cerebral palsy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. BOTOX Study Group, *Journal of Pediatric Orthopedics* 2000; 20: 108–115
27. Koman LA, Smith BP, Balkrishnam R Spasticity associated with cerebral palsy in children: guidelines for the use of botulinum A toxin. *Paediatr Drugs* 2003; 5: 11-23
28. Koman LA, Smith BP, Williams R. et al. Upper extremity spasticity in children with cerebral palsy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of the short-term outcome of treatment with botulinum A toxin. *J Hand Surg Am* 2013; 38: 435-446
29. Mayer NH. Clinicophysiology concepts of spasticity and motor dysfunction in adults with an upper motoneuron lesion. In Mayer NH, Simpson DM, eds *Spasticity: etiology, evaluation, management and the role of botulinum toxin*. New York: We Move; 2002. P. 1-10
30. Munuera L. Fisiopatología del aparato de crecimiento. En Munuera L, ed. *Introducción a la traumatología y cirugía ortopédica*. Mexico: McGraw-Hill/Interamericana; 1997. p. 118-131
31. Mutlu A, Krossschell K, Spira DG. Treadmill training with partial body-weight support in children with cerebral palsy: a systematic review. *Dev Med Child Neurol* 2009; 51: 268-275
32. Nielsen JB, Crone C, Hultborn H. The spinal pathophysiology of spasticity – from a basic science point of view. *Acta Physiol (Oxf)* 2007; 189: 171-180

33. Odding E, Roebroek ME, Stam HJ. The epidemiology of cerebral palsy: incidence, impairments and risk factors. *Disabil Rehabil* 2006; 28: 183-191
34. Palisano R, Rosenbaum P, Bartlett D, Livingston M. Clasificación de la función motora gruesa. *Dev Med Child Neurol* 1997; 39: 214-223
35. Pin TW, Elmasry J, Lewis J. Efficacy of botulinum toxin A in children with cerebral palsy in Gross Motor Function Classification System levels IV and V: a systematic review. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2013, 55: 304-313
36. Raine S. The current theoretical assumptions of the Bobath concept as determined by the members of the BBTA. *Phys Ther Pract* 2007; 3:137-152
37. Renshaw T, Green N, Griffin P, et al. Cerebral palsy: orthopaedic management. *Instr Course Lect* 1996; 45: 475-490
38. Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2006; 49: 8-14.
39. Simpson DM, Gracies JM, Graham HK, et al. Assessment botulinum neurotoxin for the treatment of spasticity (an evidence-based review). Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology 2008; 70; 1691-1698
40. Terjesen T, D Lie G, Hyldmo A, et al. Adductor tenotomy in spastic cerebral palsy. *Acta Orthopaedica* 2005; 76: 128-137
41. Verplancke D, Salisbury CF, Snape S, et al. A comparative randomised controlled trial of the management of early lower limb spasticity following acute acquired severe brain injury. *Clin Rehabil* 2005; 19: 117-125
42. Vivancos-Matellano F, Pascual SI, Nardi-Villardaga J, et al. Guía del tratamiento integral de la espasticidad. *Rev Neurol* 2007; 45: 365-375
43. Williams SA, Elliott C, Valentini J, et al. Combining strength training and botulinum neurotoxin intervention in children with cerebral palsy: the impact of muscle morphology and strength. *Disabil Rehabil* 2013; 35: 596-605
44. Wissel J, Ward AB, Erztgaard P, et al. European consensus table on the use of botulinum toxin type A in adult spasticity. *J Rehabil Med* 2009; 41: 13-25
45. Young R, Delwaide P. Drug therapy, spasticity. *N Engl J Med* 1981; 304:28-33.







as presentadas por jóvenes in-
le las V Jornadas Científicas, or-
stituto de Neurociencias «Fe-
Granada.

inician en el año 2006, respon-
Neurociencias con la formación
jóvenes (becarios y contrata-
pajo que desarrollan los distin-
s al mismo. La valiosa colabo-
de Neurociencias y el Parque
nítido que se realicen nuestros
o con la celebración de la Se-

cción del Instituto de Neuro-
pian en este libro. Su inestima-
ar la publicación periódica de
presentan y discuten en este
altados de la investigación que
adición, parece pertinente que
el título de esta serie de libros.

INSTITUTO
Neurociencias
GRANADA

Nuestro agradecimiento a la dirección del Instituto de Neurociencias y a los coautores que participan en este libro. Su inestimable ayuda ha hecho posible continuar la publicación periódica de los trabajos de investigación que se presentan y discuten en este foro. Confiando en que futuros resultados de la investigación que produce el Instituto seguirá esta tradición, parece pertinente que sea «Encuentros en Neurociencias» el título de esta serie de libros.