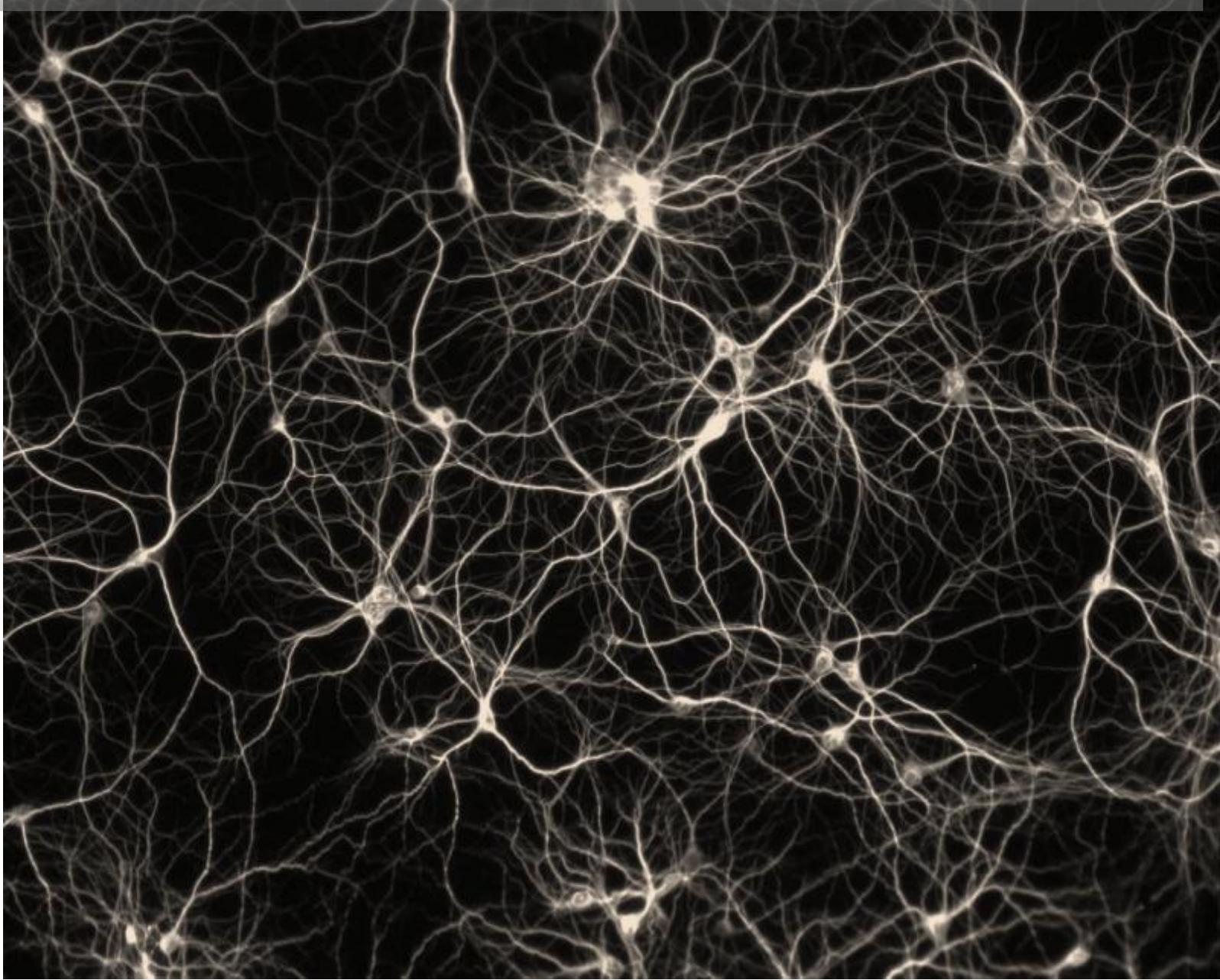
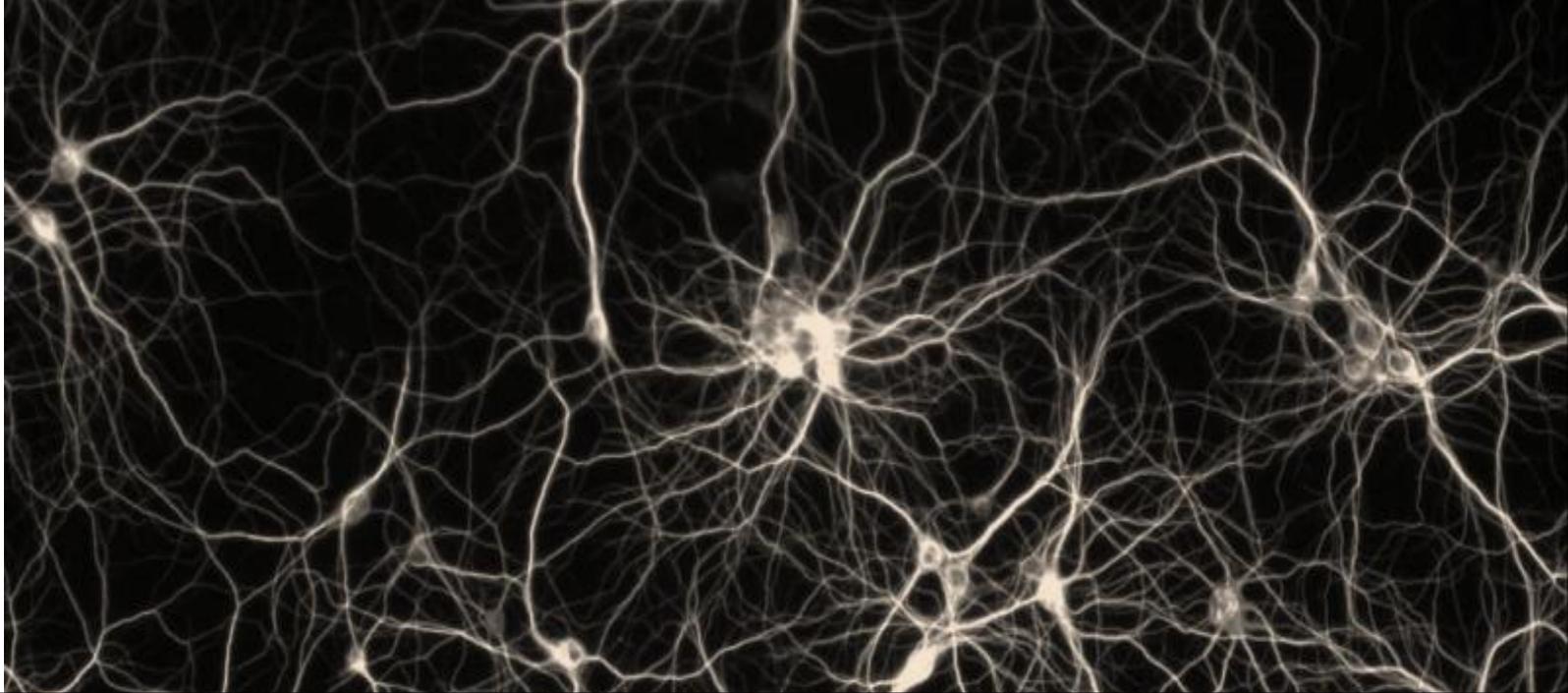
The background of the cover is a microscopic image of neurons, with cell bodies and branching processes stained in a vibrant red color against a dark background. The neurons are distributed across the entire page, with a higher density in the lower half.

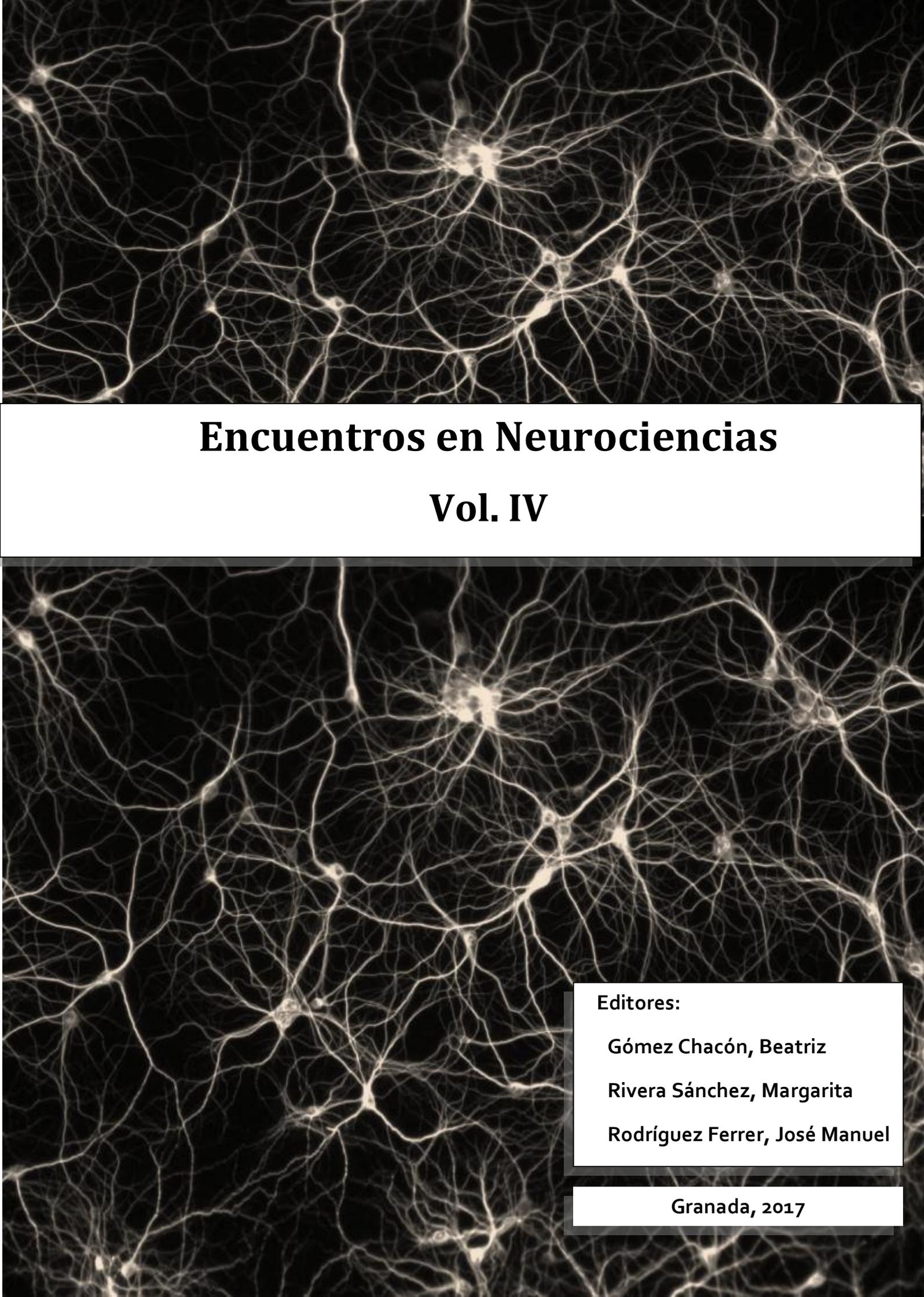
**ENCUENTROS**  
**EN**  
**NEUROCIENCIAS**  
**Vol. IV**

Editores:

Gómez Chacón, Beatriz  
Rivera Sánchez, Margarita  
Rodríguez Ferrer, José Manuel







# **Encuentros en Neurociencias**

## **Vol. IV**

**Editores:**

**Gómez Chacón, Beatriz**

**Rivera Sánchez, Margarita**

**Rodríguez Ferrer, José Manuel**

**Granada, 2017**

©DE CADA CAPÍTULO SU AUTORES.

DISEÑO CUBIERTA E INTERIOR:

BEATRIZ GÓMEZ CHACÓN

ILUSTRACIÓN DE CUBIERTA:

MARIA DEL CARMEN RUIZ CANTERO

ÁNGELES MONTILLA GARCÍA

ENRIQUE JOSÉ COBOS DEL MORAL

(CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS  
SENSORIALES PERIFÉRICAS DE RATÓN)

ISBN: 978-84-697-8282-8

IMPRESO EN ESPAÑA

*PRINTED IN SPAIN*

CUALQUIER FORMA DE REPRODUCCIÓN,  
DISTRIBUCIÓN, COMUNICACIÓN PÚBLICA O  
TRANSFORMACIÓN DE ESTA OBRA SOLO  
PUEDE SER REALIZADA CON LA  
AUTORIZACIÓN DE SUS TITULARES, SALVO  
EXCEPCIÓN PREVISTA POR LA LEY.

ENCUENTROS  
EN  
NEUROCIENCIAS  
VOL. IV

*Granada, 2017*



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA





## ÍNDICE

Relación de coautores.....	9
Capítulo 1: <b>Sistema dopaminérgico mesocorticolímbico y memoria gustativa: Relevancia del núcleo accumbens.</b> Grau-Perales A, Gallo M. ....	13
Capítulo 2: <b>Papel de las neuronas TRPV1+ en el dolor nociceptivo y en la hiperlgesia inducida por prostaglandina E2.</b> Ruiz-Cantero MC, Montilla-García Á, Perazzoli G, Sánchez-Fernández C, Baeyens JM, Cobos EJ. ....	31
Capítulo 3: <b>Estrategias metodológicas para la investigación en genética: Una aproximación al conocimiento de las enfermedades complejas.</b> Bandrés-Ciga S, Durán R, Barrero FJ, Ruz C, Vives F ....	53
Chapter 4: <b>Genetic association study of parkinson´s disease related-loci in southern Spain.</b> Bandrés-Ciga S, Duran R, Barrero FJ, Escamilla-Sevilla F, Pelegrina J, Medina JA, Ching-López A, Cervilla J, Gutiérrez B, Vives F. ....	69
Capítulo 5: <b>Evaluación y seguimiento mediante electroretinografía multifocal de pacientes con cese del tratamieto con hidroxiclороquina.</b> Ruiz-ortega J, Sáez-Moreno JA, Rodríguez-Ferrer JM.....	87
Capítulo 6: <b>Neuronas espejo.</b> Figueroa Arenas D, Rodríguez Ferrer JM .....	111
Capítulo 7: <b>Tipos de tratamiento utilizados para la fibromialgia en Andalucía.</b> Maire C, García-Leiva JM, Calandre EP .....	131
Capítulo 8: <b>Influencia de la microbiota intestinal sobre el neurodesarrollo y la obesidad en el niño.</b> Cerdó T, Campoy C.....	159

Capítulo 9: <b>Influencia del estado metabólico materno sobre el comportamiento de los hijos a los 3.5 años de edad.</b> Nieto-ruiz A, Torres-Espínola FJ, Arias M, López-Torrecillas F, Campoy C.....	183
Chapter 10: <b>The BDNF VAL66MET genetic polymorphism does not modify the association between body mass index (BMI) and major depression.</b> RIVERA M, ROVIRA P, GUTIERREZ B, CHING-LÓPEZ A, MOLINA E, MARTÍN-LAGUNA MV, ANEIRO-S-GIRALDEZ G, IBÁÑEZ-CASAS I, MCKENNEY K, RUIZ-PÉREZ I, RODRÍGUEZ-BARRANCO M, CERVILLA J .....	205

## RELACIÓN DE COAUTORES

**Aneiros-Giraldez G.** Centro de Investigación Biomédica, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad Granada.

**Arias M.** Centro de Excelencia de Investigación Pediátrica EURISTIKOS. Departamento de Pediatría, Universidad de Granada.

**Baeyens JM.** Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad Granada.

**Bandrés-Ciga S.** Departamento de Fisiología, Centro de Investigación Biomédica, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

**Barrero FJ.** Unidad de Alteraciones del Movimiento, Hospital Campus de la Salud, Universidad de Granada.

**Campoy C.** Centro de Excelencia de Investigación Pediátrica EURISTIKOS, Departamento de Pediatría, CIBERESP: Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública, Instituto Carlos III (Granadas' node), Universidad de Granada.

**Cerdó T.** Departamento de Pediatría, Centro de Excelencia de Investigación Pediátrica EURISTIKOS, Universidad de Granada.

**Cervilla J.** Departamento de Psiquiatría, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Centro de Investigación Biomédica, CIBERSAM, Universidad de Granada.

**Ching-López A.** Departamento de Psiquiatría, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Centro de Investigación Biomédica, CIBERSAM, Universidad de Granada.

**Cobos EJ.** Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad Granada. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento, Universidad Autónoma de Madrid.

**Durán R.** Departamento de Fisiología, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada.

**Escamilla-Sevilla F.** Unidad de Alteraciones del Movimiento, Hospital Campus de la Salud, Universidad de Granada.

**Figuroa-Arenas D.** Departamento de Fisiología, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

**Gallo M.** Departamento de Psicobiología, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada.

**García-Leiva JM.** Instituto de Neurociencias F. Olóriz. Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Universidad de Granada.

**Grau-Perales A.** Departamento de Psicobiología, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada.

**Gutiérrez B.** Departamento de Psiquiatría, Facultad de Medicina, Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, CIBERSAM, Universidad Granada.

**Ibanez-Casas I.** Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, Universidad Granada.

**López-Torrecillas F.** Departamento de Personalidad, Evaluación y Tratamiento Psicológico. Universidad de Granada.

**Maire C.** FIBAO, Universidad de Granada.

**Martín-Laguna MV.** Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, Universidad Granada.

**McKenney K.** Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, Universidad Granada.

**Medina JA.** Departamento de Fisiología, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada.

**Molina E.** Departamento de Enfermería, Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología, Universidad de Sevilla.

**Montilla-García Á.** Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, Universidad Granada.

**Nieto-Ruiz A.** Centro de Excelencia de Investigación Pediátrica EURISTIKOS. Departamento de Pediatría. Centro de Investigación Mente, Cerebro y Comportamiento (CYMCYC). Universidad de Granada.

**Pelegrina J.** Unidad de Alteraciones del Movimiento, Hospital Campus de la Salud, Universidad de Granada.

**Perazzoli G.** Departamento de Anatomía y Embriología, Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada.

**Pita-Calandre E.** Instituto de Neurociencias F. Olóriz. Universidad de Granada.

**Rivera M.** Departamento de Bioquímica y Biología Celular II, Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, Universidad Granada.

**Rodríguez-Ferrer JM.** Departamento de Fisiología, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

**Rodríguez-Barranco M.** Escuela Andaluza de Salud Pública, Granada.

**Rovira P.** Departamento de Psiquiatría, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona. Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, Universidad Granada.

**Ruiz-Cantero MC.** Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad Granada.

**Ruiz-Ortega J.** Departamento de Fisiología, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

**Ruiz-Pérez I.** Escuela Andaluza de Salud Pública, CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Granada.

**Ruz C.** Departamento de Fisiología, Centro de Investigación Biomédica, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad Granada.

**Sáez-Moreno J A.** Departamento de Fisiología, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

**Sánchez-Fernández C.** Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, Universidad Granada.

**Torres-Espínola FJ.** Centro de Excelencia de Investigación Pediátrica EURISTIKOS, Departamento de Pediatría, Universidad de Granada.

**Vives F.** Departamento de Fisiología, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada.

## CAPÍTULO 1

# **Sistema dopaminérgico mesocorticolímbico y memoria gustativa: relevancia del núcleo accumbens**

Grau-Perales A, Gallo M

### **Resumen**

La atenuación de la respuesta neofóbica ante sabores novedosos es un modelo ampliamente utilizado en investigación para estudiar las bases neurales y moleculares del aprendizaje y la memoria. En función de las consecuencias viscerales asociadas al consumo del sabor, el resultado del aprendizaje será distinto. Así, un sabor asociado con consecuencias viscerales aversivas producirá una aversión condicionada al sabor, un sabor asociado a consecuencias apetitivas producirá una preferencia condicionada al sabor, y un sabor sin consecuencias de forma explícita producirá una memoria de sabor segura y la atenuación de la respuesta neofóbica inicial al sabor. Sin embargo, la propia ausencia de consecuencias puede interpretarse como una consecuencia de tipo apetitivo, por lo que en este aprendizaje podría estar implicada la actividad del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, en el que juega un papel especial el núcleo accumbens. Este capítulo pretende revisar los mecanismos implicados en la formación de distintos tipos de memoria gustativa (aversiva, apetitiva y segura) en el cerebro de roedores, destacando la implicación de la actividad dopaminérgica en el núcleo accumbens, fundamentalmente a través de los receptores

de tipo D1, tanto en la formación de una memoria de sabor aversiva como en la formación de una preferencia condicionada. Se constata la escasez de estudios relativos a la participación del núcleo accumbens en la atenuación de neofobia gustativa y la necesidad de continuar la investigación en este sentido.

## ***La memoria gustativa***

La memoria gustativa es un buen modelo para estudiar las bases neurales y los mecanismos moleculares relacionados con aprendizaje y memoria. Ser capaces de recordar y reconocer un sabor tiene gran relevancia desde el punto de vista biológico, puesto que esta información permite aprender sobre la naturaleza de lo ingerido y sus consecuencias sobre el organismo. Ello determina la aceptación o el rechazo de estas sustancias en encuentros futuros y explica en buena parte la selección de los alimentos. En efecto, la presentación de sustancias con sabor novedoso desencadena una respuesta inicial de rechazo que se denomina neofobia al sabor. El rechazo o la aceptación del sabor una vez que se convierte en familiar dependen de las consecuencias viscerales que se asocian con él.

Así, tras la ingestión de un sabor novedoso se genera una memoria de dicho sabor que parece procesarse y almacenarse en paralelo en diferentes regiones cerebrales [1]. La memoria gustativa generada posee al menos dos componentes, dependiendo de las consecuencias viscerales posteriores que sean atribuidas al sabor. De esta forma, si el sabor es seguido de consecuencias viscerales negativas el sabor va a ser clasificado como aversivo y el animal evitará el consumo de dicho sabor en futuros encuentros. Este tipo de aprendizaje es denominado como aversión gustativa condicionada y puede ser inducido experimentalmente en el laboratorio. Se considera un tipo de condicionamiento clásico en el que se asocian un estímulo condicionado (EC) y un estímulo incondicionado (EI), siendo el EC el sabor y el EI malestar gástrico, que generalmente es inducido en roedores por una inyección intraperitoneal de Cloruro de Litio (LiCl). Sin embargo, si el sabor novedoso no va seguido de consecuencias viscerales aversivas, se genera una memoria gustativa segura, de manera que cuando el animal vuelva a encontrar dicho sabor en el futuro, pueda ser reconocido como seguro e incrementa su consumo, como resultado de la atenuación de la neofobia gustativa. Ambos tipos de memoria gustativas –aversiva y segura- han demostrado ser procesadas por mecanismos cerebrales compartidos, aunque algunos aspectos parecen ser específicos para cada una de ellas.

Adicionalmente, la asociación del sabor con consecuencias apetitivas, bien de naturaleza hedónica o nutritiva, induce la formación de memorias apetitivas que

conducen al desarrollo de preferencias gustativas condicionadas. El primer caso, el denominado aprendizaje sabor-sabor, un sabor neutro es emparejado con un sabor muy agradable al paladar (altamente preferido), mientras que en el segundo, denominado aprendizaje sabor-nutriente, el sabor neutro es emparejado con un nutriente específico de relevancia para la dieta, como puede ser la glucosa en el caso de animales privados de comida. En este caso, se trata de un modelo de aprendizaje de preferencias gustativas, por el que los animales de experimentación desarrollan un consumo elevado de una sustancia sávida que ha sido asociada con consecuencias reforzantes [2].

### ***Circuitos cerebrales de la memoria gustativa***

La aversión gustativa condicionada depende de un circuito neural muy bien estudiado (Figura 1A) [para una revisión 3, 4]. La formación de la asociación requiere la participación del núcleo parabraquial troncoencefálico [5] y su interacción con estructuras diencefálicas, tal como la amígdala basolateral y corticales, como la corteza insular gustativa [6]. El mantenimiento de la memoria gustativa aversiva depende tanto de la corteza insular como la amígdala entre otras áreas [7].

En cuanto a la formación de memoria gustativa segura parece implicar un circuito que incluye áreas del lóbulo temporal en el cerebro de la rata, destacando áreas como el hipocampo [8,9]; la corteza insular, cuya lesión excitotóxica impide la atenuación de neofobia y cuya actividad, mediante la proteína c-Fos, varía con la familiaridad del sabor [10,11,12,13,14]; la amígdala basolateral, estructura cuya lesión impide la atenuación de neofobia al sabor [15] y modifica la actividad de c-Fos en otras áreas relacionadas, como la corteza perirrinal, estructura que muestra una mayor actividad de la proteína c-Fos ante la presentación de sabores novedosos [16,17].

En lo que se refiere a las preferencias condicionadas al sabor, además de la participación de áreas cerebrales implicadas en el procesamiento del sabor, destaca la participación de los circuitos de neurotransmisión del sistema de reforzamiento que depende del circuito dopaminérgico mesocorticolímbico

(Figura 1B) y en el que el núcleo accumbens juega un papel esencial [18,19]. El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico comparte conexiones anatómicas funcionales con estructuras del circuito de procesamiento de sabores (ver Figura 1C).

### ***Núcleo accumbens y procesamiento del valor hedónico del sabor.***

El núcleo accumbens (NAcb) es una estructura que forma parte del estriado ventral localizada en la parte rostral y medial del prosencéfalo que en algunas nomenclaturas es incluido en la denominada amígdala extendida. Recibe aferencias dopaminérgicas del circuito meso-límbico originado en el área tegmental ventral (ATV) y representa un componente fundamental del denominado sistema de recompensa o reforzamiento. En él se pueden encontrar dos subregiones: el núcleo accumbens core (NAcb-core) y el núcleo accumbens shell (NAcb-shell), subregiones que pueden dissociarse anatómica y funcionalmente. El NAcb está ampliamente implicado en el desarrollo de conductas adictivas, en el control de la ingesta, así como en el control de aprendizajes motivacionales innatos y aprendidos [20, 21, 22].

El NAcb además parece estar implicado en el control del consumo de sabores. Así, Shimura, Kamada and Yamamoto [23] demostraron que la lesión del área tegmental ventral (ATV), la principal fuente de dopamina del sistema del mesocorticolímbico y cuyas aferencias alcanzan fundamentalmente al NAcb, redujo el consumo de sacarosa, siendo el sabor dulce innatamente preferido, frente a sabores salados, amargos y ácidos en concentraciones no preferidas (Cloruro Sódico, Clorhidrato de Quinina y ácido hidroclicó), indicando el posible papel que posee este circuito dopaminérgico en el procesamiento del valor hedónico (palatabilidad) de los sabores. Más tarde, Yamamoto [22] señaló la implicación del NAcb en el procesamiento de la palatabilidad, ya que la administración intracerebral de agonistas dopaminérgicos en este núcleo producía un incremento en el consumo de sabores menos agradables al paladar.

Bassareo y Di Chiara [24] encontraron, utilizando técnicas de microdiálisis de dopamina, que se producía un incremento significativo en la liberación de

dopamina tanto en el NAcb como en la corteza prefrontal (CPF) de ratas tras ser expuestas a un alimento con un sabor muy palatable. Esta respuesta desaparecía en el NAcb tras una segunda exposición a dicho sabor, mientras que se mantenía elevada en la CPF.

De esta manera se propone que el núcleo accumbens podría participar en el cambio del valor hedónico específico de un sabor, a través de conexiones bidireccionales con otros núcleos cerebrales, fundamentalmente la amígdala basolateral (BLA), corteza insular y otros núcleos de la amígdala extendida.



corteza insular (CI) directamente o a través de su relevo talámico en el núcleo ventroposteromedial - pars compacta (VPMpc). Desde la IC, existen proyecciones eferentes sobre otras áreas corticales de asociación, destacando la corteza perirrinal (PER). Tanto AMY como IC mantienen conexiones anatómicas recíprocas entre sí y con el núcleo accumbens (NAcb). B) Conexiones del circuito dopaminérgico mesocorticolímbico en el cerebro de la rata. La principal fuente de dopamina se corresponde con el área tegmental ventral (VTA) que surte de este neurotransmisor al NAcb. Desde allí, las proyecciones dopaminérgicas alcanzan la corteza orbitofrontal medial (MOFC) y mPFC así como núcleos subcorticales como AMY. El NAcb además proyecta hacia el pálido ventral (VP), núcleo que junto con la zona incerta (ZI) regulan la liberación de dopamina en el hipotálamo lateral (LH). LH proyecta información al PBN que regula la liberación de dopamina en el VTA, a modo de feedback negativo del circuito. C) Interacciones entre ambos circuitos, destacando zonas relevantes para la memoria gustativa como AMY, PBN y NAcb.

### ***Núcleo accumbens y formación de la memoria gustativa***

Los distintos tipos de memoria gustativa descritos inducen alteraciones en el consumo de los sabores debido a cambios en su palatabilidad. Por ello, no es descartable que el sistema de recompensa esté implicado en cada uno de ellos. Uno de los aspectos más estudiados ha sido la participación selectiva de las subregiones del núcleo accumbens tanto en sabores seguros como aversivos. En conjunto, los hallazgos sugieren que ambas subregiones (NAcb-core y NAcb-shell) estarían implicadas en la formación de una memoria gustativa aversiva, pero solamente la región del shell (NAcb-shell) se relacionaría con la formación de un sabor seguro (ver Tabla 1 en ANEXO).

Así, Ramírez-Lugo, Zavala-Vega y Bermúdez-Rattoni [25] estudiaron el papel de los neurotransmisores glutamato y acetilcolina en el NAcb utilizando una tarea de atenuación de neofobia y una tarea de aversión condicionada al sabor, respectivamente. En ambas tareas, administraron AP-5 (dl-2-amino-5 Phosphonopentanoate, antagonista selectivo de receptores de N-methyl-d-aspartate, NMDA) y escopolamina (antagonista no selectivo de receptores colinérgicos muscarínicos) antes de la primera exposición a un sabor novedoso (sacarina). Tanto la inyección de escopolamina como de AP-5 impidieron la adquisición de una aversión condicionada al sabor cuando fueron administradas en ambas regiones (NAcb-core y NAcb-shell). Sin embargo, la atenuación de la

neofobia gustativa sólo se vio interrumpida por la administración de escopolamina (pero no AP-5) administrada en el núcleo accumbens shell, mientras no obtuvo efecto en el core.

Más recientemente, Núñez-Jaramillo, Rangel-Hernández, Burgueño-Zúñiga y Miranda [26] encontraron que la inducción de actividad glutamatérgica mediante NMDA aplicada tras la primera exposición a un sabor novedoso impidió tanto la recuperación de una aversión condicionada al sabor como la atenuación de neofobia al sabor.

Adicionalmente, se ha estudiado el efecto de la inactivación reversible del NAcb-shell mediante la administración intracerebral de anisomicina resultando en una interrupción de la atenuación de neofobia al sabor [18].

Otros sistemas de neuromodulación participan en la adquisición de ambos tipos de memoria de sabores. En este sentido, Whichmann, Fornari y Roozendaal [27] demostraron que la administración de propanolol (antagonista de  $\beta$ -adrenorreceptores) en el núcleo accumbens core y shell interfirió con la atenuación de neofobia a una solución de sacarina y con la adquisición de una aversión condicionada cuando la sacarina fue emparejada con una administración de LiCl. Sin embargo, su administración en el NAcb-core únicamente produjo efecto sobre la aversión condicionada. Además, también demostraron que la administración de RU28362 (un agonista de receptores de glucocorticoides de tipo GR) en el NAcb produjo los efectos opuestos (facilitación tanto de la aversión condicionada como de la atenuación de neofobia), indicando una gran relevancia del sistema noradrenérgico en la consolidación de memoria de sabor aversiva y segura en el núcleo accumbens.

### ***Dopamina y memoria gustativa***

De acuerdo con la relevancia del circuito dopaminérgico mesocorticolímbico en el procesamiento del valor hedónico de los sabores, la formación tanto de aversiones como preferencias gustativas parece estar estrechamente relacionada con la neurotransmisión en este circuito.

- ***Dopamina y aversión gustativa condicionada***

Fenu, Bassareo y Di Chiara [28] demostraron la implicación de la neurotransmisión dopaminérgica en NAcb-core empleando una tarea de aversión gustativa condicionada. Expusieron a ratas a una solución novedosa de sacarosa (15%) seguida por la administración sistémica de LiCl en diferentes intervalos temporales. Además, inyectaron sistémicamente e intracerebralmente SCH23390 y SCH39166 (antagonistas selectivos de receptores D1 de dopamina) o vehículo (solución salina) entre la exposición al sabor y el LiCl. Los resultados indicaron que la administración de los antagonistas dopaminérgicos impidió la formación de una memoria gustativa aversiva. Esta ausencia de aversión condicionada fue especialmente evidente para el caso de administraciones intracerebrales realizadas en el NAcb-core.

Posteriormente, Fenu y Di Chiara [29] replicaron los resultados anteriores en un nuevo experimento con administración intracerebral de anfetamina (como agonista dopaminérgico con gran afinidad por receptores de tipo D1) en el intervalo entre el sabor y el LiCl. Los resultados mostraron que la administración de anfetamina produjo facilitación de la adquisición de la aversión gustativa condicionada. Con este experimento demostraban que la actividad de los receptores dopaminérgicos D1 en el núcleo accumbens es necesaria para la adquisición de una memoria gustativa aversiva.

- ***Dopamina y preferencia condicionada de sabores***

La dopamina y los receptores D1 especialmente, han obtenido una considerable atención en el estudio de la formación de la memoria gustativa apetitiva, bien sea sabor-sabor o sabor nutriente. Tanto en el aprendizaje sabor-sabor como sabor-nutriente la actividad de los receptores dopaminérgicos D1 parece jugar un papel crucial [30, 2]. Estudios farmacológicos han demostrado que la actividad de los receptores D1 implicados en el procesamiento de preferencias de sabores interacciona con la actividad glutamatérgica, a través de receptores de NMDA en el NAcb [31]. Algo similar ocurre en otros núcleos incluidos en el sistema del reforzamiento, como son núcleos de la amígdala, fundamentalmente la basolateral

y central [32] y el hipotálamo lateral [33, 34] que participan directamente en el control de la ingesta de sabores muy palatables. La co-localización de receptores D1 y NMDA también se produce en zonas del estriado ventral a nivel post-sináptico, incluyendo el núcleo accumbens [35].

En contraposición al interés que ha suscitado el estudio de la relación entre los receptores D1 y otras modalidades de memoria gustativa, su posible participación en la atenuación de neofobia gustativa permanece inexplorada.

### ***Conclusión***

Como hemos visto, la aversión gustativa condicionada y el condicionamiento de preferencias gustativas se utilizan como paradigmas de aprendizaje en los que se empareja un sabor con consecuencias aversivas o apetitivas, respectivamente, mientras que en la atenuación de neofobia gustativa la ingestión de un sabor desconocido no va seguida de consecuencias. Sin embargo, la ausencia de consecuencias podría constituir en sí misma un reforzador positivo, de manera que un sabor que inicialmente es consumido con cautela, incrementa su valor hedónico, y como consecuencia, el consumo en sucesivas exposiciones a medida que se produce la atenuación de la respuesta neofóbica. Este planteamiento cobra mayor fuerza teniendo en cuenta las condiciones experimentales a las que suelen estar sometidos los animales de experimentación durante los procedimientos de atenuación de neofobia. Por cuestiones metodológicas, los animales suelen tener acceso restringido a la bebida, por lo que están sedientos y muy motivados a beber. Aunque los procedimientos incluyen sesiones de rehidratación que permiten a los animales poder tener acceso a suficiente bebida como para evitar la deshidratación, ello no impide que estén sedientos durante la sesión experimental. Por este motivo, a pesar de que el sabor no va emparejado explícitamente con ninguna consecuencia, el hecho de poder beber constituye un reforzador por sí mismo, por lo que hay que tener en cuenta posibles fenómenos de aprendizaje apetitivo subyacentes.

El neurotransmisor dopamina ha demostrado ser fundamental en el procesamiento de sabores y en la adquisición de aprendizaje gustativo tanto de tipo aversivo como apetitivo. Se ha estudiado en profundidad el papel del núcleo accumbens y su neurotransmisión a través de los receptores dopaminérgicos de tipo D1 en la adquisición de aversiones gustativas condicionadas, así como en la adquisición de preferencias gustativas. Sin embargo, son escasos los datos que estudian el papel del núcleo accumbens en el proceso de atenuación de neofobia. Según nuestro conocimiento, tampoco existe a penas investigación sobre el papel que desempeña la dopamina y el sistema de reforzamiento en general en el desarrollo de la atenuación de neofobia gustativa. Por tanto, se hace necesaria nueva investigación sobre esta cuestión.

### ***Agradecimientos***

Este trabajo ha sido financiado por PSI2014-57643-P (MINECO) y por FPU14/01531 (MEC).

**Anexo**

**Tabla 1.** Resumen de estudios farmacológicos del núcleo accumbens core y shell en atenuación de neofobia (AN) y aversión condicionada al sabor (ACS).

<i>Subregión</i>	<i>Aprendizaje</i>	<i>Sustancia</i>	<i>Acción</i>	<i>Neurotransmisor</i>	<i>Efecto</i>	<i>Referencia</i>
<b>Shell</b>	<b>AN</b>	AP-5	antagonista	Glutamato	No	25
		Escopolamina	antagonista	Acetilcolina	Interrupción	25
		Anisomicina	Inhibidor	Síntesis proteínas	Interrupción	18
		Propranolol	antagonista	Noradrenalina	No	27
		RU28368	Agonista	Glucocorticoides	Facilitación	27
	<b>ACS</b>	AP-5	antagonista	Glutamato	Interrupción	25
		Escopolamina	antagonista	Acetilcolina	Interrupción	25
		Propranolol	antagonista	Noradrenalina	Interrupción	27
		RU28368	Agonista	Glucocorticoides	Facilitación	27
		<b>Core</b>	<b>AN</b>	AP-5	antagonista	Glutamato
NMDA	Agonista			Glutamato	Interrupción	26
Escopolamina	antagonista			Acetilcolina	No	25
Propranolol	antagonista			Noradrenalina	Interrupción	27
RU28368	Agonista			Glucocorticoides	Facilitación	27
<b>ACS</b>	AP-5		antagonista	Glutamato	Interrupción	25
	NMDA		Agonista	Glutamato	Interrupción	26
	Escopolamina		antagonista	Acetilcolina	Interrupción	25
	Propranolol		antagonista	Noradrenalina	Interrupción	27
	RU28368		Agonista	Glucocorticoides	Interrupción	27

## ***Bibliografía***

1. Bermúdez-Rattoni F. (2004). Molecular mechanisms of taste recognition memory. *Nature Reviews, Neuroscience*. 5(3), 209-217
2. Sclafani A, Touzani K, Bodnar RJ. (2011). Dopamine and learned food preferences. *Physiology and Behavior*. 104, 64-68
3. Bures J, Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T. (1998). Conditioned Taste Aversion: Memory of a special kind. DOI:10.1093/acprof:oso/9780198523475.001.0001
4. Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yashoshima Y, Sakai N. (1994). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioral Brain Research*. 65(2), 123-137
5. Iovana SF, Bures J. (1990). Acquisition of conditioned taste aversion in rats is prevented by tetrodotoxin blockade of a small midbrain region centered around the parabrachial nuclei. *Physiology and Behavior*. 48(4). 543-549.
6. Gallo M, Bures J. (1991). Acquisition of conditioned taste aversion in rats is mediated by ipsilateral interaction of cortical and mesencephalic mechanisms. *Neuroscience Letters*. 133(2), 187-190.
7. Yamamoto T. (1993). Neural substrates of taste aversion learning. *Neuroscience Research*. 16(3), 181-185
8. Balderas I, Morin JP, Rodríguez-Ortiz CJ, Bermúdez-Rattoni F. (2012). Muscarinic receptors activity in the perirhinal cortex and hippocampus has differential involvement in the formation of recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. 97, 418-424

9. Manrique T, Morón I, Ballesteros MA, Guerrero RM, Fenton AA, Gallo M. (2009). Hippocampus, aging and segregating memories. *Hippocampus*. 19, 57-65
10. Bahar A, Dudai Y, Ahissar Ehud. (2004). Neural signature of taste familiarity in the gustatory cortex of freely behaving rat. *Journal of Neurophysiology*. 92, 3298-3308
11. Bahar A, Dudai Y, Ahissar Ehud. (2004). Neural signature of taste familiarity in the gustatory cortex of freely behaving rat. *Journal of Neurophysiology*. 92, 3298-3308
12. Bermúdez-Rattoni F. (2014). The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*. 109, 207-218
13. Lin JY, Roman C, Reilly S. (2012). Taste neophobia and c-Fos expression in the rat brain. *Brain Research*. 1448, 82-88
14. Miranda I, Ferreira G, Ramírez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F. (2003). Role of cholinergic system on the construction of memories: taste memory encoding. *Neurobiology of Learning and Memory*. 80, 211-222
15. Moraga-Amaro R, Cortés-Rojas A, Simón F, Stethberg J. (2014). Role of the insular cortex in taste familiarity. *Neurobiology of Learning and Memory*. 109, 37-45
16. Gómez-Chacón B, Gámiz F, Gallo M. (2012). Basolateral amygdala lesions attenuate safe taste memory-related c-fos expression in the rat perirhinal cortex. *Behavioural Brain Research*. 230, 418-422

17. Gómez-Chacón B, Morillas E, Gallo M. (2015). Altered perirhinal cortex activity patterns during taste neophobia and their habituation in aged rats. *Behavioral Brain Research*. 281, 245-249
18. Gutiérrez R, De la Cruz V, Rodríguez-Ortiz JC, Bermúdez-Rattoni F. (2004). Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learning and Memory*. 11, 95-101
19. Pedroza-Llinás R, Ramírez-Lugo L, Guzmán-Ramos K, Zavala-Vega S, Bermúdez-Rattoni F. (2009). Safe taste memory consolidation disrupted by a protein synthesis inhibitor in the nucleus accumbens shell. *Neurobiology or Learning and Memory*. 92, 45-52
20. Ramírez-Lugo L, Núñez-Jaramillo L, Bermúdez-Rattoni F. (2007). Taste memory formation: role of the nucleus accumbens. *Chemical Senses*. 32(1), 93-97
21. Bassareo V, Di Chiara G. (1999). Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience*. 89(3), 637-641
22. Bassareo V, De Luca MA, Di Chiara G. (2002). Differential expression of motivational stimulus properties by dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*. 22(11), 4708-4719
23. Yamamoto T. (2006). Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Archives of Histology and Cytology*. 69 (4), 243-255
24. Bassareo V, Di Chiara G. (1997). Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and

- accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *The Journal of Neuroscience*. 17(2), 851-861
25. Shimura T, Kamada Y, Yamamoto T. (2002). Ventral tegmental lesions reduce overconsumption of normally preferred taste fluids in rats. *Behavioural Brain Research*. 134, 123-130
26. Ramírez-Lugo L, Zavala-Vega S, Bermúdez-Rattoni F. (2006). NMDA and muscarinic receptors of the nucleus accumbens have differential effects on taste memory formation. *Learning and Memory*. 13, 45-51
27. Núñez-Jaramillo L, Rangel-Hernández JA, Burgueño-Zúñiga B, Miranda I. (2012). Activation of nucleus accumbens NMDA receptors differentially affects appetitive or aversive taste learning and memory. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 6, DOI=10.3389/fnbeh.2012.00013.
28. Wichamnn R, Fornari R, Roozendaal B. (2012). Glucocorticoids interact with noradrenergic arousal system in the nucleus accumbens shell to enhance memory consolidation of both appetitive and aversive taste learning. *Neurobiology of Learning and Memory*. 98, 197-205
29. Fenu S, Bassareo V, Di Chiara G. (2001). A role of dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *The Journal of Neuroscience*. 21(17), 6897-6904
30. Fenu S, Di Chiara G. (2003). Facilitation of conditioned aversion learning by systemic amphetamine: role of nucleus accumbens shell dopamine D1 receptors. *European Journal of Neuroscience*. 18. 2025-2030
31. Bodnar RJ. (2016). Conditioned flavor preferences in animals: merging pharmacology, brain sites and genetic variance. *Appetite*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2016.12.015>

32. Touzani K, Bodnar RJ, Sclafani A. (2008). Activation of dopamine D1 receptors in the nucleus accumbens is critical for the acquisition, but not expression, of glucose-conditioned flavor preference in rats. *European Journal of Neuroscience*. 27. 1525-1533
33. Touzani K, Bodnar RJ, Sclafani A. (2013). Glucose-conditioned flavor preference learning requires co-activation of NMDA and dopamine D1-like receptors within the amygdala. *Neurobiology of Learning and Memory*. 106. 95-101
34. Amador NJ, Rotella FM, Bernal SY, Malkuzs D, De la Cruz JA, Badalia A, Duenas SM, Hossain M, Gerges M, Kandov S, Touzani K, Sclafani A, Bodnar RJ. (2014). Effect of dopamine D1 and D2 receptor antagonism in the lateral hypothalamus on expression and acquisition of fructose-conditioned flavor preference in rats. *Brain Research*. 1542. 70-78
35. Touzani K, Bodnar RJ, Sclafani A. (2009). Lateral hypothalamus dopamine D1-like receptors and glucose-conditioned flavor preferences in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*. 92. 464-467
36. Tarazi FI, Baldessarini RJ. (1999). Regional localization of dopamine and ionotropic glutamate receptor subtypes in striatolimbic brain regions. *Journal of Neuroscience Research*. 55. 401-410

## CAPÍTULO 2

# Papel de las neuronas TRPV<sub>1</sub><sup>+</sup> en el dolor nociceptivo y en la hiperalgesia inducida por prostaglandina E<sub>2</sub>

Ruiz-Cantero MC, Montilla-García Á, Perazzoli G, Sánchez-Fernández C, Baeyens JM, Cobos EJ

### Resumen

**Introducción:** El receptor TRPV1 es un canal catiónico presente en neuronas C peptidérgicas, que en condiciones normales (dolor nociceptivo) codifican para estímulos térmicos dolorosos, aunque no para estímulos mecánicos. La prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) es un sensibilizador periférico producido durante el dolor crónico. Este alógeno produce la fosforilación de los receptores TRPV1 contribuyendo a la hiperalgesia térmica. La PGE<sub>2</sub> también produce hiperalgesia mecánica, aunque no se conocen completamente los mecanismos implicados. Por otro lado, se ha descrito que los receptores TRPV1 podrían participar en la hipersensibilidad mecánica, aunque por mecanismos desconocidos hasta el momento. Por lo tanto, nos planteamos si la PGE<sub>2</sub> podría producir hiperalgesia tanto mecánica como térmica actuando en las neuronas C peptidérgicas mediante la sensibilización del TRPV1. Y por ello, nuestro objetivo fue determinar el papel de las neuronas C peptidérgicas y del TRPV1 en el dolor nociceptivo y en la hiperalgesia inducida por PGE<sub>2</sub> frente a estímulos térmicos y mecánicos.

**Material y Métodos:** Se utilizaron ratones CD1. El dolor nociceptivo mecánico se evaluó mediante el test de presión de la

pata (450g) y el térmico en la placa caliente unilateral (55°C). Para la evaluación de la hiperalgesia mecánica y térmica inducida por PGE2 se realizaron los mismos tests, aunque utilizando intensidades de estimulación menores (100g y 42°C).

**Resultados:** El tratamiento con resiniferatoxina eliminó selectivamente las neuronas TRPV1+ en el DRG. Los animales desprovistos de neuronas TRPV1+ aumentaron la latencia de respuesta frente el estímulo térmico pero no frente al estímulo mecánico, en una situación de dolor nociceptivo. La administración de PGE2 indujo hiperalgesia frente a estímulos térmicos y mecánicos, siendo ambas dependientes de la presencia de neuronas TRPV1+. Por último, la administración intraplantar de rojo rutenio (un antagonista TRP), SB366791 (un antagonista selectivo TRPV1), o H-89 (un inhibidor de la PKA) revirtió la hiperalgesia mecánica.

**Conclusiones:** Las neuronas C peptidérgicas son necesarias para el dolor nociceptivo frente a estímulos térmicos pero no frente a estímulos mecánicos. Sin embargo, estas neuronas participan en la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2, mediante la activación del TRPV1 por la acción de la acción de la PKA.

## **Introducción**

El receptor TRPV1 (de sus siglas en inglés Transient Receptor Potential Vanilloid-1) es un canal catiónico presente en neuronas C peptidérgicas [1, 2], que en condiciones normales (dolor nociceptivo) codifican para estímulos térmicos dolorosos (>43 °C), aunque no para estímulos mecánicos [3]. Los receptores TRPV1 se consideran actualmente como un integrador molecular de la sensibilización periférica [4].

La sensibilización periférica se define según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) como el aumento de la capacidad de respuesta de las neuronas nociceptivas periféricas. Este proceso participa en la ganancia sensorial que ocurre en el dolor de diversa etiología, incluyendo dolor inflamatorio [5], neuropático [6] y canceroso [7], y puede producirse por una amplia variedad de algógenos químicos liberados por diversos tipos celulares. Estos algógenos incluyen sustancias tales como la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [8].

La prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) activa receptores de Eicosanoides/Prostanoides que están acoplados a proteína G [9] y produce la fosforilación de los receptores TRPV1, principalmente por la ruta PKA, aunque también por el sistema PKC [5, 8]. Se sabe que este mecanismo de fosforilación de TRPV1 mediado por PGE<sub>2</sub> es uno de los principales desencadenantes de la hiperalgesia térmica en condiciones de inflamación [4, 5]. La PGE<sub>2</sub> también produce hiperalgesia mecánica [10, 11], aunque no se conoce completamente el mecanismo de este proceso.

Por otro lado, hay estudios que muestran que los receptores TRPV1, en condiciones de dolor patológico (como en el dolor inflamatorio o canceroso), podrían participar en la hipersensibilidad a estímulos mecánicos, y no únicamente a estímulos térmicos [4]. Sin embargo, no se conoce cómo un transductor para estímulos térmicos podría participar en la generación de la hipersensibilidad mecánica. Una explicación podría ser que la sensibilización de las neuronas TRPV<sub>1+</sub> por algógenos químicos (como la PGE<sub>2</sub>) pudiera alterar la especificidad de los estímulos codificados por estos nociceptores, aunque esta hipótesis no ha sido estudiada previamente.

Nuestro objetivo fue determinar el papel de las neuronas TRPV1+ en el dolor nociceptivo y en la hiperalgesia inducida por PGE2 frente a estímulos térmicos y mecánicos.

## ***Métodos***

### **▪ *Animales***

Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD-1 para todos los experimentos (Charles River, S.A., Barcelona, España). Las pruebas comportamentales se realizaron durante la fase de luz (9:00-15:00 horas) y al azar a lo largo del ciclo estral. Los animales fueron manipulados de acuerdo con la Directiva Europea 2010/63, y los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la UGR y por la Junta de Andalucía.

### **▪ *Fármacos, sensibilizador periférico y su administración in vivo***

Se utilizó el sensibilizador periférico PGE2 (Tocris, Madrid, España). Para estudiar el mecanismo de las acciones de la PGE2, evaluamos los efectos de rojo rutenio (Sigma-Aldrich, Madrid, España), un antagonista TRP [12], de SB-366791 (Tocris) un antagonista selectivo TRPV1 [13], y de H-89 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Alemania), un inhibidor de la PKA [11]. Todos estos productos se administraron de manera intraplantar (i.pl.), en un volumen de 20 µl. La PGE2 se administró 10 min antes de la evaluación comportamental. El rojo rutenio, el SB-366791 y el H-89 se administraron 20 min antes de la administración de PGE2, es decir 30 min antes de la evaluación de la hiperalgesia. Como control se administró el solvente de estos productos (salino) por la misma ruta y volumen.

### **▪ *Evaluación del dolor nociceptivo y la hiperalgesia frente a estímulos mecánicos y térmicos***

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. 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. El dolor nociceptivo mecánico se evaluó mediante el test de presión de la pata (450 g) y el térmico en la placa caliente unilateral (55 °C). En el test de presión de la pata se utilizó un analgesímetro de presión (modelo 37215; Ugo-Basile, Varese, Italia), midiendo el tiempo de latencia hasta el forcejeo, se estimuló la pata trasera con una estructura cónica con la punta roma, según los procedimientos habituales en nuestro laboratorio [14, 15]. Y para el test de placa caliente unilateral se empleó una placa caliente (analgesímetro modelo PE34, Series 8, IITC Life Science Inc., Victory Blvd, Los Ángeles), midiendo el tiempo de latencia de retirada de la pata, según el procedimiento habitual en nuestro laboratorio [16]. Para la evaluación de la hiperalgesia mecánica y térmica se realizaron los mismos tests conductuales, pero en este caso, se utilizaron intensidades de estimulación menores (100 g y 42 °C).

- ***Eliminación in vivo de los nociceptores C peptidérgicos (TRPV1+)***

Las acciones de las neuronas C peptidérgicas (TRPV1+) pueden estudiarse in vivo mediante su eliminación selectiva con resiniferatoxina (RTX), un superagonista TRPV1, que promueve la entrada masiva de calcio y la consecuente muerte celular de las neuronas TRPV1+ [17]. La RTX (Sigma-Aldrich) se administró por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 50 µg/kg, 5 días antes de la evaluación comportamental y los ensayos inmunohistoquímicos, como se ha descrito previamente [17].

- ***Ensayos de inmunomarcaje***

La eficacia del tratamiento con RTX se determinó mediante ensayos inmunohistoquímicos del ganglio de la raíz dorsal (DRG) L4, correspondiente a la innervación de la pata. Después de los 5 días tras la administración de RTX o su solvente, se realizó la perfusión intracardiaca de los animales y se diseccionó el DRG L4. Posteriormente el tejido se fijó, se deshidrató y se incluyó en parafina

siguiendo procedimientos estándares. Las muestras se cortaron en un microtomo en secciones de 5 micras y se realizó el estudio inmunohistoquímico con anticuerpos fluorescentes para marcar TRPV1 y NeuN (como marcadores de las neuronas C peptidérgicas y de todas las poblaciones neuronales, respectivamente). Para el estudio inmunohistoquímico los cortes se desparafinaron en xilol (Panreac Quimica, Castellar del Vallès, España) y se procedió a la rehidratación. Para el desenmascaramiento antigénico se utilizó tampón citrato 1% (Master diagnóstica, Granada, España). Los cortes se incubaron durante 1 hora en solución de bloqueo (5% suero de burro en tampón Tris (TBS), 0,3% Triton X-100 y 0,1% Tween 20). A continuación, se incubaron los cortes durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra anti-TRPV1 (VR1 P-19, 1: 100, Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo de conejo anti-NeuN (ABN78, 1: 500, Merck Millipore, Madrid, España), en solución de bloqueo. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, los cortes se lavaron tres veces durante 10 min y se incubaron durante 1 h con los anticuerpos secundarios; un anticuerpo de burro anti-cabra Alexa Fluor-488 (A11055) y un anticuerpo de cabra anti-conejo Alexa Fluor-594 (A11012) (1: 500 para ambos anticuerpos, Life Technologies, Alcobendas, España). Por último, los portaobjetos se lavaron tres veces durante 10 minutos y se montaron con ProLong® Gold Antifade Mountant (Life Technologies). Las imágenes seleccionadas para este trabajo fueron capturadas en un microscopio confocal Nikon A1 (Instruments Europe BV, Amsterdam, Países Bajos) del Servicio de Microscopía del Centro de Instrumentación Científica de la UGR.

- ***Estadística***

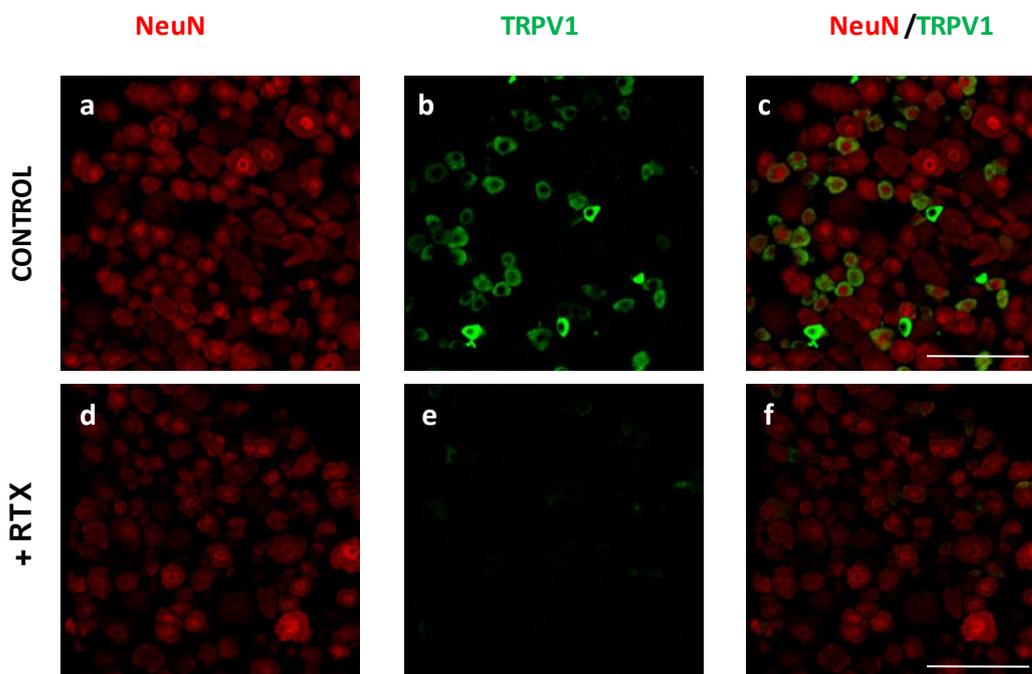
Se usó el programa Sigma Plot 12 para realizar los análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías según el experimento, seguido del test de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de p fue menor a 0,05.

## Resultados

### ▪ *Eliminación de las neuronas C peptidérgicas (TRPV1+) mediante el tratamiento con RTX*

El marcaje inmunohistoquímico de NeuN, de un corte del ganglio de la raíz dorsal (DRG) L4 de animales control (tratados con el solvente de la RTX) mostró neuronas sensoriales cuyos somas son de tamaños diversos (Fig. 1a). Sin embargo, el marcaje de TRPV1 se detectó exclusivamente en neuronas de pequeño tamaño (Fig. 1b). Todas las neuronas que expresaron TRPV1, expresaron además NeuN, mientras que la gran mayoría de las neuronas NeuN+ no expresaron TRPV1 (Fig. 1c).

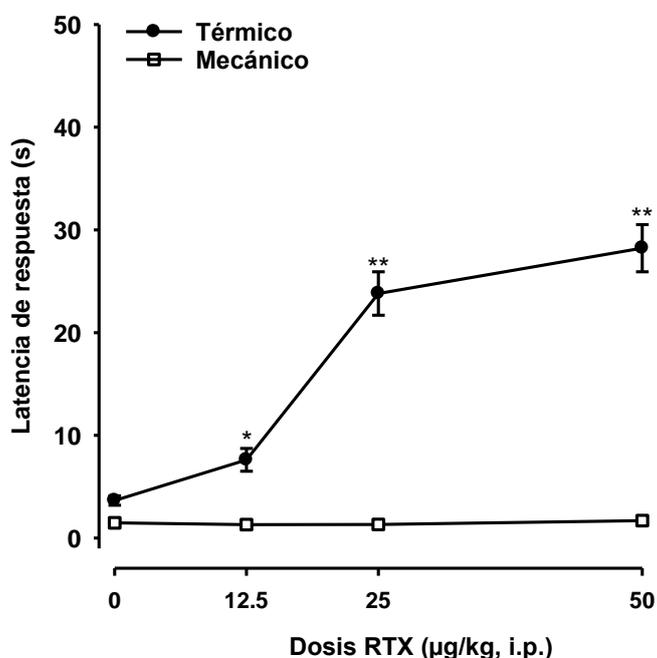
Cuando se administró la RTX (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), previo al estudio inmunohistoquímico, pese a que el marcaje de NeuN estuvo preservado de manera global (Fig. 1d), no se observó esta subpoblación de neuronas TRPV1+ (Fig. 1e y f). Por lo tanto, la administración de RTX es capaz de eliminar in vivo las neuronas sensoriales TRPV1+, sin afectar a la globalidad de las neuronas del DRG.



**Fig. 1** Inmunohistoquímica del ganglio de la raíz dorsal (DRG) L4. Marcaje de NeuN (a) y de TRPV1 (b), en animales control, así como la combinación de las imágenes a y b (c). Marcaje de NeuN (d), TRPV1 (e) y su combinación (f) en el DRG de animales tratados con RTX (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i. p.) 5 días antes de la extracción de las muestras.

▪ ***Papel de las neuronas TRPV1+ en el dolor nociceptivo frente a estímulos mecánicos y térmicos***

La latencia de respuesta frente a un estímulo térmico de 55 °C aumentó al administrar RTX (12,5, 25 y 50 µg/kg) de forma dosis dependiente hasta una dosis de 50 µg/kg que eliminó por completo todas las neuronas TRPV1+ (Fig. 2). Sin embargo, la latencia de respuesta frente a un estímulo mecánico de 450 g no varió al administrar las diferentes dosis de RTX (Fig. 2). Estos resultados indican que la eliminación in vivo de neuronas TRPV1+ afecta de manera diferencial al dolor nociceptivo inducido por estímulos sensoriales térmicos y mecánicos.



**Fig. 2** Efecto de la administración de resiniferatoxina (RTX) en la respuesta frente a estímulos nociceptivos térmicos y mecánicos. Los resultados muestran la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 450g, y la latencia de retirada de la pata ante un estímulo térmico de 55°C, en ratones tratados con distintas dosis de RTX administrada vía intraperitoneal (i.p.). Diferencias significativas entre los valores de los animales tratados con RTX y su solvente (control): \*p<0,05; \*\*p<0,01 (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

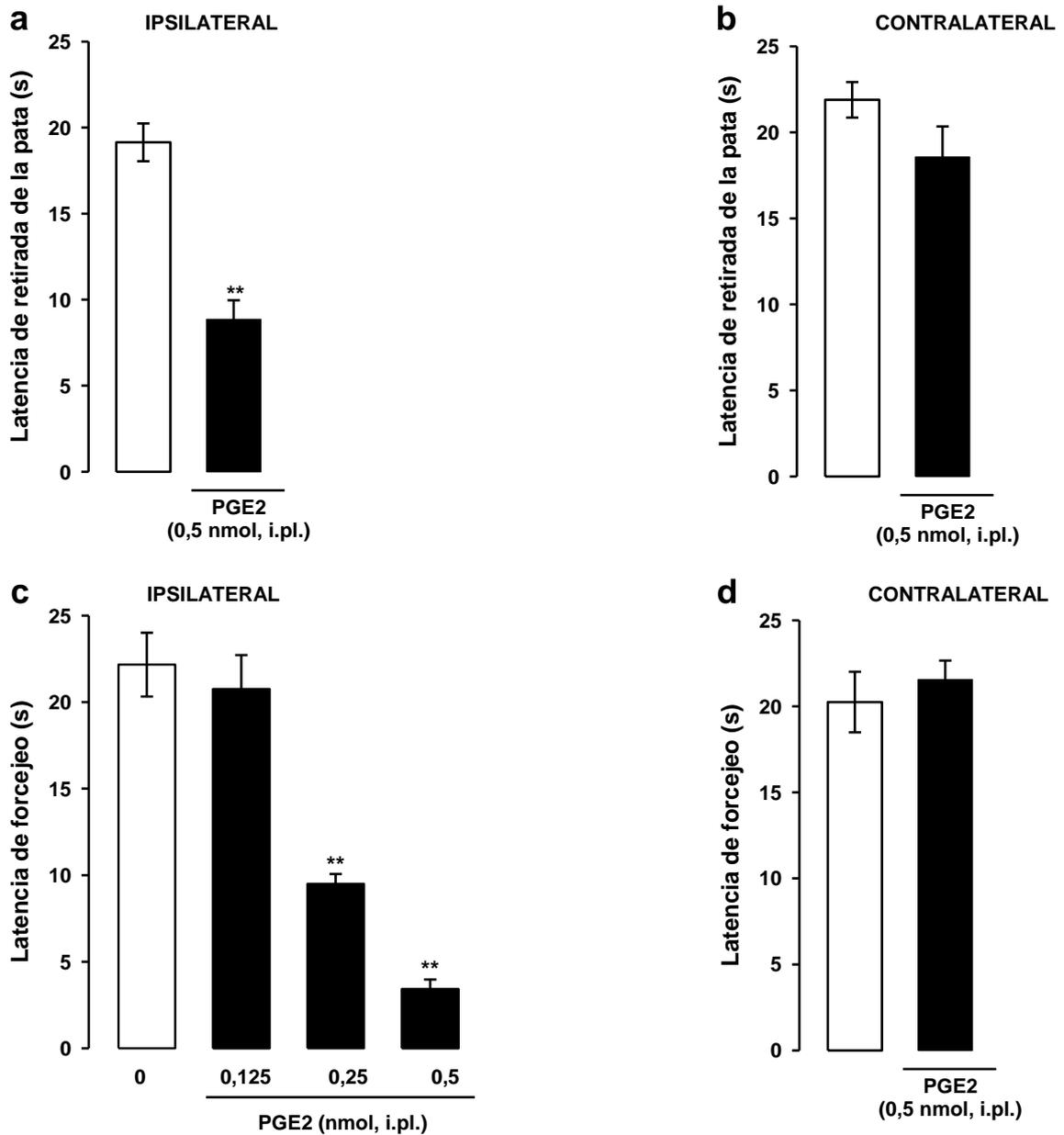
- ***Hiperlgesia térmica y mecánica inducida por PGE<sub>2</sub>***

La administración i.pl. de PGE<sub>2</sub> 0,5 nmol disminuyó la latencia de respuesta frente al estímulo térmico (42°C), indicando por tanto la aparición de hiperalgesia térmica (Fig. 3a).

Sin embargo, la administración de PGE<sub>2</sub> en la pata contralateral a la estimulación térmica, no indujo cambio alguno en la latencia de respuesta en comparación con animales control (administrados con el solvente del alógeno) (Fig. 3b). Esto indica que la sensibilización al estímulo térmico se produjo de manera local en el sitio de administración de la PGE<sub>2</sub>.

Para estudiar los efectos de la PGE<sub>2</sub> en la hiperalgesia mecánica, utilizamos varias dosis de este sensibilizador periférico (0,125, 0,25 y 0,5 nmol). La administración de PGE<sub>2</sub> disminuyó la latencia de respuesta frente al estímulo mecánico (100 g) de forma dosis dependiente (Fig. 3c), indicando el desarrollo de hiperalgesia mecánica.

Al igual que para el estudio de la hiperalgesia térmica inducida por PGE<sub>2</sub>, la administración de PGE<sub>2</sub> en la pata contralateral a la estimulación mecánica no alteró la latencia de respuesta (Fig. 3d), indicando que la hiperalgesia al estímulo mecánico inducida por PGE<sub>2</sub> es producida a nivel local en el sitio de administración de PGE<sub>2</sub>. Por lo tanto, la PGE<sub>2</sub> produce tanto hiperalgesia mecánica como térmica en la zona de administración.



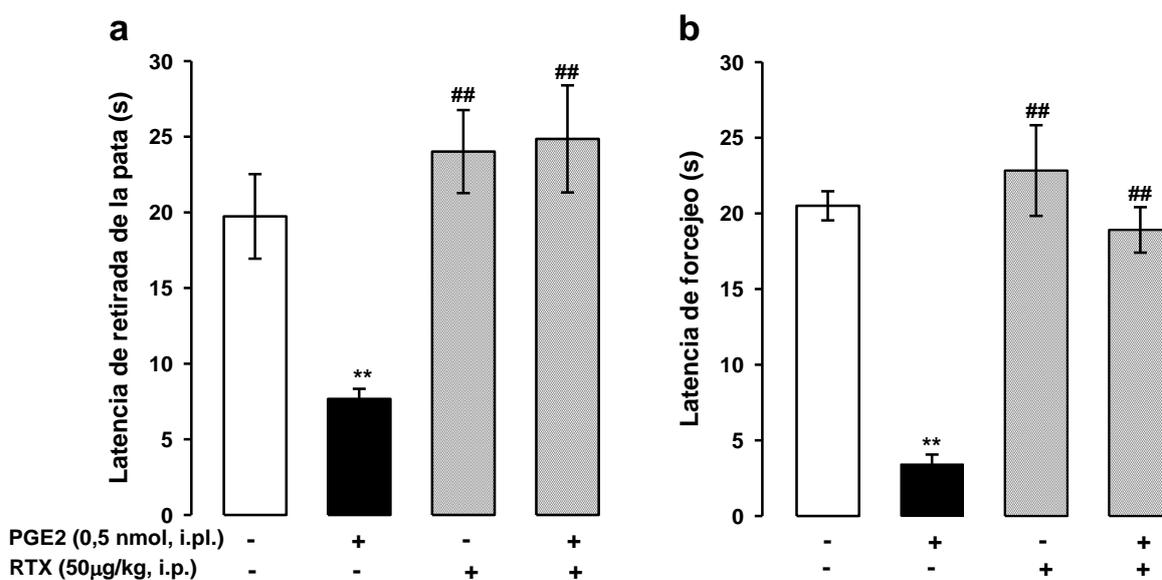
**Fig. 3** Efecto de la administración de PGE2 en la respuesta frente a estímulos térmicos y mecánicos. Los resultados muestran la latencia de retirada de la pata ante un estímulo térmico de 42 °C en ratones tratados con PGE2 (0,5 nmol) administrada vía intraplantar (i.pl.) en la pata ipsilateral a la evaluación (a) y la latencia de respuesta de la pata contralateral a la administración de PGE2 (0,5 nmol, i.pl.) (b). Además, se representa la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en ratones tratados con distintas dosis de PGE2 (0,125, 0,25 y 0,5 nmol, i.pl.) en la pata ipsilateral a la evaluación (c) y en la pata contralateral a la administración de PGE (0,5 nmol, i.pl.) (d). Diferencias significativas entre los valores de los animales tratados con PGE2 y su solvente (control): \*\* $p < 0,01$  (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

▪ **Efecto de la RTX en la hiperalgesia térmica y mecánica inducida por PGE2**

Para estudiar si las neuronas TRPV1+ participaban en la codificación del estímulo térmico y mecánico durante la sensibilización por PGE2, se eliminó in vivo esta población neuronal mediante el tratamiento previo con RTX.

La administración de RTX no indujo cambio en la latencia de respuesta en animales tratados con el solvente de la PGE2 y estimulados con una temperatura de 42°C (Fig. 4a) o 100g de presión (Fig. 4b). Sin embargo, la administración de RTX fue capaz de revertir completamente la hiperalgesia inducida por PGE2, no sólo frente al estímulo térmico (Fig. 4a), si no también frente al estímulo mecánico (Fig. 4b).

Por lo tanto, las neuronas TRPV1+ son necesarias para el desarrollo de la hiperalgesia inducida por PGE2 tanto frente a estímulos térmicos como mecánicos.



**Fig. 4** Efecto de la administración de resiniferatoxina (RTX) en la hiperalgesia inducida por PGE2 frente a estímulos térmicos y mecánicos. Los resultados muestran la latencia de retirada de la pata ante un estímulo térmico de 42 °C en ratones tratados intraplantarmente (i.pl.) con PGE2 0,5 nmol o su solvente, y tratados intraperitonealmente (i.p.) con RTX (50 µg/kg) 5 días antes de la evaluación, o su solvente (a), y la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en ratones tratados con PGE2 i.pl. o su solvente, y con RTX i.p. o su solvente (b). Diferencias significativas entre los valores de los animales tratados con PGE2 sin RTX y su control: \*\* $p < 0,01$ , y entre animales tratados con RTX con o sin PGE2 y el solvente con PGE2: ## $p < 0,01$  (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

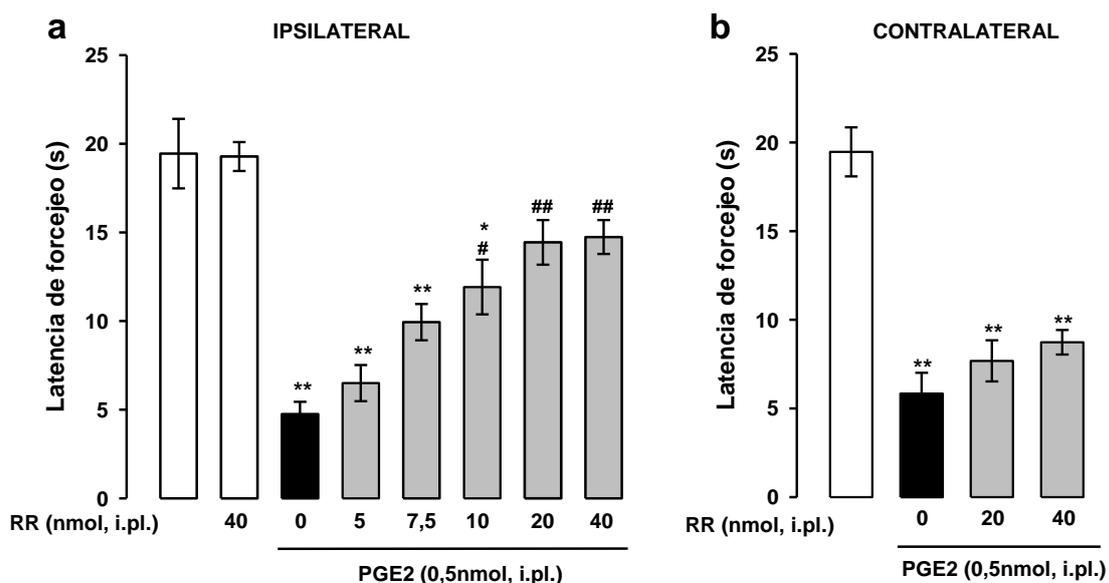
▪ ***Efecto del antagonismo TRP (Rojo Rutenio)***

Puesto que la eliminación de las neuronas TRPV1+ abolió la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2, estudiamos mediante el uso de herramientas farmacológicas qué transductores presentes en estas neuronas participaban en el desarrollo de este proceso.

La administración local del antagonista TRP rojo rutenio (40 nmol) no alteró la respuesta de los animales sin sensibilización sometidos a la estimulación mecánica (Fig. 5a). Sin embargo, La administración de este antagonista TRP (5-40 nmol), en la pata sensibilizada con PGE2, revirtió de manera dosis-dependiente la hiperalgesia mecánica inducida por este alógeno (Fig. 5a).

Para estudiar si el efecto del rojo rutenio se producía de manera local, administramos las dosis más altas estudiadas (20 y 40 nmol) en la pata contralateral a la evaluación, donde se administró la PGE2. En este caso, el antagonista TRP no tuvo efecto alguno en la hiperalgesia inducida por PGE2 (Fig. 5b), indicando que a las dosis utilizadas su administración i.pl. producía un efecto local (Fig. 5b).

Estos resultados indican que los TRPs participan en la hiperalgesia mecánica que se produce localmente en respuesta a la acción de PGE2.



**Fig. 5** Efecto del antagonista de TRPs rojo rutenio en la hiperalgesia inducida por PGE2 frente a estímulos mecánicos. Los resultados muestran la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en la pata ipsilateral a la administración intraplantar (i.pl.) de PGE2 0,5 nmol o su solvente, y tratados con distintas dosis de rojo rutenio (5; 7,5; 10; 20; 40 i.pl.) o su solvente (a), y la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en la pata contralateral a la administración de PGE2 (0,5 nmol, i.pl.) o su solvente, y con rojo rutenio (20 y 40 nmol, i.pl.) o su solvente (b). Diferencias significativas entre los valores de los tratados con el solvente y el resto de grupos experimentales: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , y entre los animales tratados con PGE2 sola o en asociación con el rojo rutenio: # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

#### ▪ *Efecto del antagonismo TRPV1 (SB-366791)*

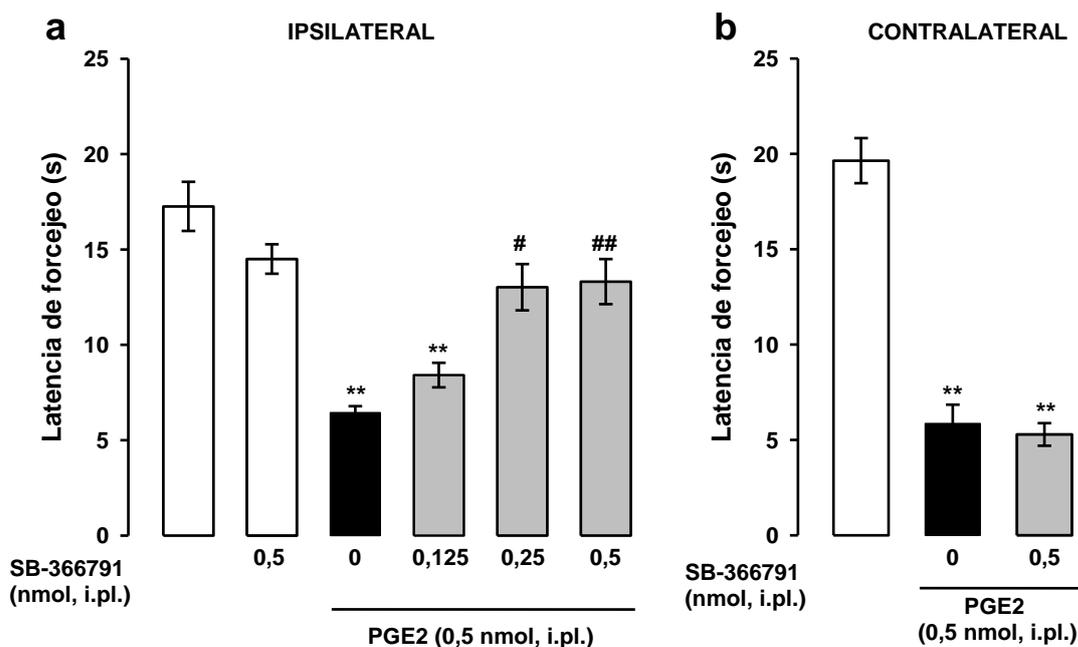
Además, investigamos si el TRPV1 en concreto es el responsable de la producción de la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2. Para ello, estudiamos los efectos del SB-366791, un antagonista selectivo de los TRPV1.

La administración local de SB-36679 (0,5 nmol) no alteró la respuesta de los animales sin sensibilización sometidos a la estimulación mecánica (Fig. 6a). Sin embargo, la administración de SB-36679 (0,125-0,5 nmol) en la pata inyectada con PGE2, indujo un claro incremento dosis dependiente en la latencia de respuesta de los animales sometidos a la estimulación mecánica (Fig. 6a).

Para estudiar si los efectos antihiperálgicos del SB-36679 se producían de manera local, en la zona sensibilizada por PGE2, la dosis más alta empleada de este antagonista TRPV1 (0,5 nmol) se inyectó en la pata contralateral a la

administración de PGE2. En este caso, la administración de SB-36679 no revirtió la hiperalgesia mecánica (Fig. 6b).

Estos resultados indican que los receptores TRPV1 de la zona sensibilizada por PGE2 están implicados en la producción de la hiperalgesia mecánica.



**Fig. 6** Efecto del antagonista selectivo de TRPV1 SB-366791 en la hiperalgesia inducida por PGE2 frente a estímulos mecánicos. Los resultados muestran la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en la pata ipsilateral a la administración intraplantar (i.pl.) de PGE2 0,5 nmol o su solvente, y tratados con distintas dosis SB-366791 (0,125; 0,25; 0,5 nmol, i.pl.) o su solvente (a), y la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en la pata contralateral a la administración de PGE2 (0,5 nmol, i.pl.) o su solvente, y con SB-366791 (0,5 nmol, i.pl.) o su solvente (b). Diferencias significativas entre los valores de los tratados con el solvente y el resto de grupos experimentales: \*p<0,05; \*\*p<0,01, y entre los animales tratados con PGE2 sola o en asociación con el SB-366791 ##p<0,01 (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

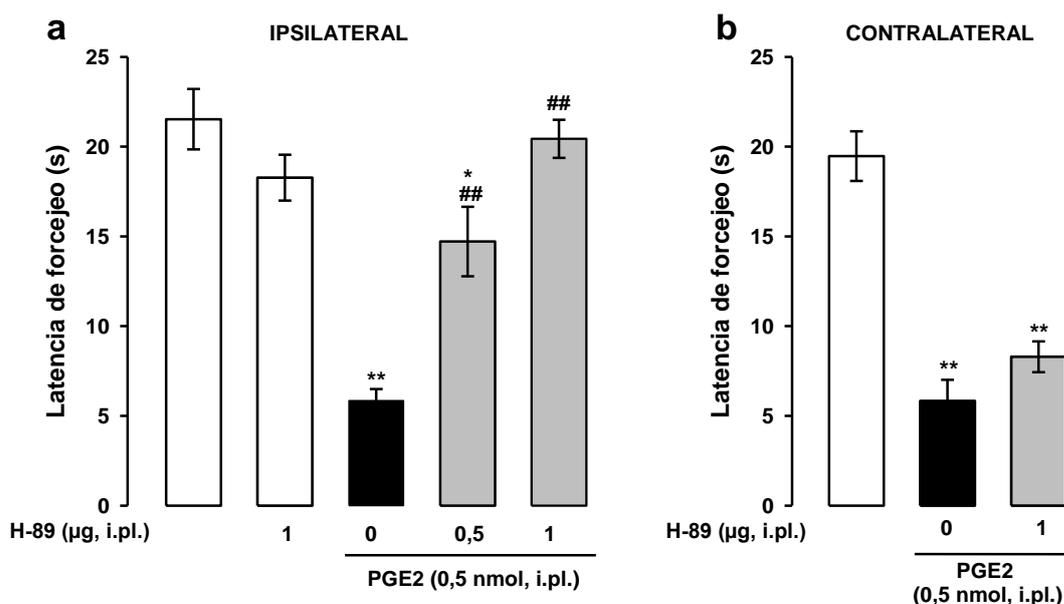
#### ▪ Efecto de la inhibición de la PKA (H-89)

Para determinar si los TRPV1 participan en la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2 mediante su sensibilización por la ruta de la PKA, estudiamos los efectos del H-89, un antagonista de esta quinasa intracelular.

De manera análoga a los resultados obtenidos con el rojo rutenio o el SB-36679, la administración local del H-89 (1  $\mu$ g) no alteró la respuesta comportamental frente al estímulo mecánico en animales sin sensibilización (Fig. 7a). Sin embargo, la administración de este inhibidor de la PKA (0,5-1  $\mu$ g, i.pl.) en la pata inyectada con PGE2, aumentó de manera dosis dependiente la latencia de forcejeo al aplicar el estímulo mecánico (Fig. 7a).

Sin embargo, la administración de H-89 (1  $\mu$ g) en la pata contralateral a la inyección de PGE2 no aumentó la latencia de respuesta de los animales (Fig. 7b).

Estos resultados indican que la acción de la PKA en la zona de administración de la PGE2 es necesaria para el desarrollo de la hiperalgesia mecánica.



**Fig. 7** Efecto del inhibidor de PKA H-89 en la hiperalgesia inducida por PGE2 frente a estímulos mecánicos. Los resultados muestran la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en la pata ipsilateral a la administración intraplantar (i.pl.) de PGE2 0,5 nmol o su solvente, y tratados con distintas dosis de H-89 (0,5; 1  $\mu$ g, i.pl.) o su solvente (a), y la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en la pata contralateral a la administración de PGE2 (0,5 nmol, i.pl.) o su solvente, y con H-89 (1  $\mu$ g, i.pl.) o su solvente (b). Diferencias significativas entre los valores de los tratados con el solvente y el resto de grupos experimentales: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , y entre los animales tratados con PGE2 sola o en asociación con el H-89 ## $p < 0,01$  (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

## ***Discusión***

En este estudio mostramos que la eliminación in vivo de las neuronas TRPV1+ no altera el dolor nociceptivo frente al estímulo mecánico, pero sí frente al estímulo térmico. Sin embargo, previene la hiperalgesia inducida por PGE2 tanto frente a estímulos térmicos como mecánicos. Además, la hiperalgesia mecánica depende de la acción de la PKA y es revertida por el antagonismo de los TRP, en concreto por el antagonismo TRPV1.

Está ampliamente descrito que los receptores TRPV1 están presentes mayoritariamente en neuronas sensoriales pequeñas (nociceptores C) peptidérgicas [1, 2]. Esto encaja con nuestros resultados de inmunohistoquímica, en los que se aprecia que el marcaje de TRPV1 se localiza en las neuronas de pequeño calibre. El tratamiento con RTX (50 µg/kg) eliminó completamente esta población de neuronas TRPV1+ en el DRG, como ha sido previamente descrito usando esta misma dosis y ruta de administración [17].

La eliminación de las neuronas TRPV1+ modificó la latencia de respuesta frente a un estímulo nociceptivo térmico de alta intensidad (55°C), mientras que no alteró las respuestas comportamentales inducidas por una estimulación térmica de intensidad moderada (42°C). Estos resultados concuerdan con el umbral de activación de en torno a 43°C de los TRPV1 [3], que constituyen el principal transductor de estímulos térmicos dolorosos de las neuronas C peptidérgicas [3, 18].

Sin embargo, mostramos que la eliminación de las neuronas TRPV1+, no alteró las respuestas frente a un estímulo nociceptivo mecánico de alta intensidad (55°C). Estos resultados concuerdan con los descritos previamente, en los que el tratamiento con RTX afecta de manera diferencial a los estímulos sensoriales térmicos y mecánicos [19]. Nuestros resultados por lo tanto confirman el papel de las neuronas C peptidérgicas en el dolor frente estímulos térmicos de alta intensidad pero no mecánicos, e ilustran la especificidad del sistema somatosensorial en la codificación de los estímulos sensoriales.

La PGE2 es uno de los sensibilizadores periféricos más estudiados, y posiblemente uno de los algógenos químicos producidos durante el dolor crónico

más relevantes [9]. El tratamiento local con PGE2 indujo un estado de hiperalgesia tanto frente a estímulos sensoriales térmicos como mecánicos, como se ha mostrado en diversos estudios previos [10, 20, 21].

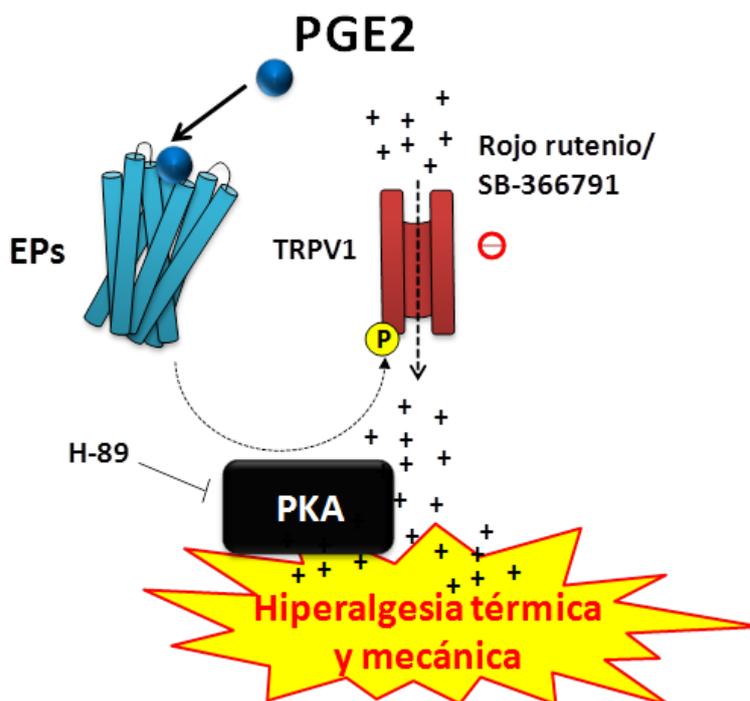
La eliminación de las neuronas sensoriales TRPV1+ eliminó completamente la hiperalgesia térmica inducida por PGE2. Lo cual sugiere que las neuronas C peptidérgicas juegan un papel fundamental en el proceso de hiperalgesia térmica, como apoyan otros estudios [3, 18]. Curiosamente, la eliminación de estas neuronas también eliminó completamente la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2. Esto indica que las neuronas C peptidérgicas, durante la sensibilización por PGE2, son capaces de codificar no sólo para los estímulos térmicos, sino también para los estímulos mecánicos. Estos resultados no se han descrito previamente.

Además, mostramos que el antagonismo farmacológico de los TRPs, y en concreto de los TRPV1, es capaz de eliminar la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2. Se ha descrito que los antagonistas TRPV1 disminuyen la hipersensibilidad a los estímulos mecánicos en modelos animales de dolor inflamatorio y canceroso [revisado por 4]. Nuestros datos sugieren que durante el proceso de sensibilización, la activación de los TRPV1 juega un papel fundamental para que las neuronas C peptidérgicas alteren la especificidad de los estímulos que codifican, siendo capaces en estas circunstancias de ser activadas mediante estímulos mecánicos, y por lo tanto explicando los efectos de los antagonistas TRPV1 en la hipersensibilidad mecánica en modelos de dolor crónico.

Por último, hemos explorado el mecanismo intracelular por el cual los TRPV1 podrían ser sensibilizados contribuyendo al desarrollo de hiperalgesia mecánica. Para ello nos hemos basado en el mecanismo descrito en la hiperalgesia térmica inducida por PGE2 por otros autores, en el que la actividad de la PKA juega un papel fundamental [5, 8]. En este estudio mostramos que la administración del inhibidor de la PKA H-89 es capaz de eliminar la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2, indicando que la actividad de esta quinasa es necesaria para la hipersensibilidad mecánica inducida por PGE2.

Se desconoce si otros sensibilizadores periféricos que sensibilizan los TRPV1, tales como la bradiquinina [5], también podrían alterar la especificidad de

los estímulos que codifican las neuronas C peptidérgicas, al igual que ocurre con la sensibilización inducida por PGE2 mostrada en este estudio. Además, tampoco se ha explorado si sensibilizadores de otros tipos neuronales, como por ejemplo agonistas de los receptores P2X3, presentes en nociceptores no peptidérgicos [1, 22, 23], podrían tener un efecto similar. Los nociceptores no peptidérgicos juegan un papel muy relevante en el dolor nociceptivo frente a estímulos de origen mecánico, mientras que no participan en el dolor nociceptivo frente a estímulos térmicos [24]. Sin embargo, se ha descrito que el agonista P2X3  $\alpha$ ,  $\beta$ -metilén-ATP es capaz de producir hiperalgesia mecánica y térmica [23], por lo que podrían producir un resultado similar en las neuronas no peptidérgicas al que mostramos aquí con PGE2 en nociceptores peptidérgicos, aunque usando una maquinaria de transducción diferente. Estas hipótesis merecen ser exploradas en estudios futuros.



**Fig. 8** Representación esquemática del mecanismo de acción de la PGE2 en neuronas C peptidérgicas. La PGE2 se une a receptores de Eicosanoides/Prostanoides (EPs) que están acoplados a proteína G y produce la fosforilación de los receptores TRPV1, principalmente por la ruta de PKA. Esta fosforilación de TRPV1 permite la entrada de cationes y produce una sensibilización periférica que contribuye a la hiperalgesia térmica y mecánica. Esta ruta puede ser interrumpida (y por tanto la hiperalgesia) utilizando un antagonista de

Capítulo 2: Papel de las neuronas TRPV<sub>1</sub><sup>+</sup> en el dolor nociceptivo y en la hiperalgesia inducida por prostaglandina E<sub>2</sub>

TRPs (rojo rutenio), un antagonista selectivo de TRPV1 (SB-366791) o por un inhibidor de la PKA (H-89).

### ***Conclusiones***

Nuestros datos indican que las neuronas C peptidérgicas son necesarias para el dolor nociceptivo frente a estímulos térmicos pero no frente a estímulos mecánicos. Sin embargo, estas neuronas participan en la hiperalgesia mecánica inducida por PGE<sub>2</sub>, mediante la activación del TRPV1 por la acción de la PKA (Fig. 8). Estos datos apoyan el potencial analgésico de los antagonistas de TRPV1 (más allá de frente a estimulaciones térmicas) en situaciones de sensibilización del sistema nociceptivo. Además, ilustran la plasticidad del sistema somatosensorial y abren la puerta a estudios futuros para profundizar en los procesos de sensibilización de los diferentes subtipos de nociceptores.

### ***Agradecimientos***

MINECO (SAF2013-47481P y SAF2016-80540-R), Junta de Andalucía (grupo CTS 109), fondos FEDER, Esteve y el Programa de Reincorporación de Doctores de la UGR.

## ***Bibliografía***

1. Woolf CJ, Ma Q. (2007). Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*. 55(3):353-64.
2. Dubin AE, Patapoutian A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 120(11): 3760–3772.
3. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 288(5464):306-13.
4. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov*. 6(5):357-72.
5. Bhave G, Gereau RW. (2004). Posttranslational mechanisms of peripheral sensitization. *J Neurobiol*. 61(1):88-106.
6. Scholz J, Woolf CJ. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*. 10(11):1361-8.
7. Hua B, Gao Y, Kong X, Yang L, Hou W, Bao Y. (2015). New insights of nociceptor sensitization in bone cancer pain. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19(2):227-43.
8. Cheng JK, Ji RR. (2008). Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res*. 33(10):1970-8.
9. Lin CR, Amaya F, Barrett L, Wang H, Takada J, Samad TA, Woolf CJ. (2006). Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther*. 319(3):1096-103.

10. Kassuya CA, Ferreira J, Claudino RF, Calixto JB. (2007). Intraplantar PGE<sub>2</sub> causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br J Pharmacol.* 150(6):727-37.
11. Araldi D, Ferrari LF, Levine JD (2015) . Repeated Mu-Opioid Exposure Induces a Novel Form of the Hyperalgesic Priming Model for Transition to Chronic Pain. *J Neurosci.* 35(36):12502-17.
12. Nasser A, Ali S, Wilsbech S, Bjerrum OJ, Møller LB. (2015). Intraplantar injection of tetrahydrobiopterin induces nociception in mice. *Neurosci Lett.* 584:247-52.
13. Ferreira J, Trichês KM, Medeiros R, Calixto JB. (2005). Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain.* 117(1-2):171-81.
14. Sánchez-Fernández C, Montilla-García Á, González-Cano R, Nieto FR, Romero L, Artacho-Cordón A, Montes R, Fernández-Pastor B, Merlos M, Baeyens JM, Entrena JM, Cobos EJ. (2014). Modulation of peripheral  $\mu$ -opioid analgesia by  $\sigma$ 1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 348(1):32-45.
15. Tejada MA, Montilla-García A, Sánchez-Fernández C, Entrena JM, Perazzoli G, Baeyens JM, Cobos EJ. (2014). Sigma-1 receptor inhibition reverses acute inflammatory hyperalgesia in mice: role of peripheral sigma-1 receptors. *Psychopharmacology (Berl).* 231(19):3855-69.
16. Montilla-García Á, Sánchez-Fernández C, Cobos EJ, Baeyens JM. En: Encuentros en Neurociencias III 2016: 157-170. Eds: Montes Ramírez MR, García Leiva JM, Durán Ogalla R. Editorial Universidad de Granada.
17. Hsieh YL, Lin CL, Chiang H, Fu YS, Lue JH, Hsieh ST. (2012). Role of peptidergic nerve terminals in the skin: reversal of thermal sensation by calcitonin gene-related peptide in TRPV1-depleted neuropathy. *PLoS One.* 7(11).

18. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 405(6783):183-7.
19. Bishnoi M, Bosgraaf CA, Premkumar LS. (2011). Preservation of acute pain and efferent functions following intrathecal resiniferatoxin-induced analgesia in rats. *J Pain*. 12(9):991-1003.
20. Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Colucci M, Margheriti F, Melchiorri P, Vellani V, Tian H, De Felice M, Porreca F. (2006). Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior. *J Neurosci*. 26(25):6716-27.
21. Cunha TM, Souza GR, Domingues AC, Carreira EU, Lotufo CM, Funez MI, Verri WA Jr, Cunha FQ, Ferreira SH. (2012). Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3K $\gamma$ /AKT/nNOS/NO signaling pathway. *Mol Pain*. 8:10.
22. Robinson LE, Murrell-Lagnado RD. (2013). The trafficking and targeting of P2X receptors. *Front Cell Neurosci*. 7:233.
23. Kwon SG, Roh DH, Yoon SY, Choi SR, Choi HS, Moon JY, Kang SY, Kim HW, Han HJ, Beitz AJ et al. (2016). Role of peripheral sigma-1 receptors in ischaemic pain: Potential interactions with ASIC and P2X receptors. *Eur J Pain*. 594-606.
24. Bogen O, Joseph EK, Chen X, Levine JD. (2008). GDNF hyperalgesia is mediated by PLC $\gamma$ , MAPK/ERK, PI3K, CDK5 and Src family kinase signaling and dependent on the IB4-binding protein versican. *Eur J Neurosci*. 28(1):12-9.

## CAPÍTULO 3

# **Estrategias metodológicas para la investigación en genética: Una aproximación al conocimiento de las enfermedades complejas**

Bandrés-Ciga S, Durán R, Barrero FJ, Ruz C, Vives F

### **Resumen**

La primera edición del “libro de la vida” vino con la publicación de la secuencia del genoma humano hace 15 años [1], seguida de la descripción de catálogos detallados de variabilidad genética a través del proyecto HapMap (<http://www.hapmap.org>). Todo ello marcó un emocionante punto de partida para el estudio de la genética de las enfermedades complejas. Como consecuencia, el desarrollo y la mejora de estrategias metodológicas para estudiar el genoma de forma sistemática, rápida y rentable, se ha convertido en una realidad. En los últimos años, el advenimiento de nuevas tecnologías para la investigación en genética, ha revolucionado la forma que tenemos de entender la salud humana y los mecanismos patogénicos implicados en la enfermedad.

El presente capítulo ofrece una visión actual de la tecnología de secuenciación y genotipado como estrategias metodológicas para el estudio genético, examinando sus ventajas e inconvenientes respecto a métodos tradicionales. Estas tecnologías han llevado a la consecución de logros científicos trascendentales, contribuyendo a la resolución de las bases genéticas de enfermedades complejas.

## ***Introducción***

Reich y Lander, junto con un numeroso equipo de investigadores, tardaron 13 años en descifrar el genoma humano a un coste de 3 mil millones de dólares. Hoy en día, un genoma humano puede secuenciarse en menos de una semana por alrededor de 1000 dólares. La comunidad científica es capaz de desentramar la estructura del material genético, estudiar a fondo su variación e interpretar sus efectos sobre el fenotipo clínico de una manera antes inimaginable.

La aplicación de nuevas tecnologías ha supuesto un cambio radical en la investigación en genética. El descubrimiento de genes causantes o loci que predisponen a enfermedades se está produciendo a una velocidad sin precedentes. La invención y la mejora de los enfoques tecnológicos, han permitido la identificación de mutaciones causales raras que subyacen a las formas mendelianas de la enfermedad, a través de tecnología de secuenciación, así como de variantes de susceptibilidad mediante los llamados estudios de genotipado a gran escala. Estos avances han promovido enormemente la capacidad de los científicos para identificar nuevas rutas moleculares involucradas en la etiología de un gran número de enfermedades.

El genoma humano diploide está constituido por alrededor de 6.000 millones de bases de ADN almacenado en 23 pares de cromosomas. Sin embargo, tan sólo una pequeña fracción de la secuencia total del genoma, llamado exoma, es codificante y se traducirá a proteínas. Aunque hoy en día el número exacto de genes es todavía desconocido, se cree que existen aproximadamente 21.000 genes codificadores de proteínas (1% -2%). El resto del genoma no codificante está formado por genes que originan ARN, secuencias reguladoras tales como intrones, y ADN repetitivo en el que la función es poco conocida [2].

Con la finalidad de comprender el tipo de estrategia metodológica que debemos emplear para llevar a cabo un estudio genético, a continuación se abordará de forma general los distintos tipos de variantes genéticas que podemos encontrar en la molécula de ADN.

Dentro del ADN, existen varias clases diferentes de variaciones. El tipo más común de variante es la sustitución de una sola base. Cuando una sustitución está presente en más del 1% de la población, se conoce como polimorfismo de

nucleótido simple (SNP) o variante común. Existen aproximadamente 3 millones de dichas variantes en el ADN humano, surgiendo cada 1000 pares de bases aproximadamente. Éstas se encuentran a menudo en regiones no codificantes del genoma y tienen un efecto fenotípico pequeño (odds ratio <1,5). Se piensa que los SNPs, en su mayoría, confieren riesgo para una determinada enfermedad alterando la expresión génica de un gen, ya sea modificandola transcripción, alterando el *splicing*, o la localización subcelular de la proteína. La variabilidad de SNPs ha sido ampliamente estudiada en muchas poblaciones étnicamente diversas mediante iniciativas como la Proyecto Internacional HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). HapMap ha establecido las características, patrones de equilibrio de ligamiento y frecuencias alélicas de SNPs a lo largo del genoma de individuos procedentes de 4 orígenes ancestrales diferentes. El objetivo de esta iniciativa fue el de crear una base de datos de acceso abierto a la comunidad investigadora, constituyendo una valiosa herramienta para los estudios de genotipado a gran escala de los que hablaremos más adelante ([www.gwascentral.org](http://www.gwascentral.org)).

Por otro lado, cuando una sustitución está presente en menos del 1% de la población, se conoce como mutación o variante rara. Estas variantes suelen tener profundos efectos fenotípicos, alterando de forma muy deletérea la secuencia de un gen que codifica a una determinada proteína.

La variación genómica también puede ser debida a múltiples reorganizaciones estructurales llamadas “Indels”, originadas por inserciones o deleciones que varían en tamaño, generalmente desde 1 a 1000 pares de bases. Dichas variantes pueden tener un efecto sustancial sobre dominios esenciales de la proteína, originando a menudo un cambio en el marco de lectura del ADN y resultando en una proteína truncada. Inserciones o deleciones de mayor tamaño se denominan variantes en el número de copias (CNVs) y pueden ser tanto comunes como raras [2].

## ***Identificación de variantes comunes asociadas a enfermedades complejas. Diferentes técnicas y abordajes***

Se ha hipotetizado que la presencia de múltiples variantes de riesgo comunes contribuyen sustancialmente a la patogénesis de las formas esporádicas de inicio tardío de las enfermedades complejas, exhibiendo efectos pequeños.

La investigación sobre las causas de las enfermedades complejas que predisponen de forma global a las formas esporádicas, prescindiendo de aquellas que siguen un patrón de herencia mendeliana clásica, se fundamenta en gran medida, en los estudios de asociación caso-control.

El objetivo de estos estudios es analizar y comparar las frecuencias alélicas de variantes genéticas comunes en un grupo de pacientes con respecto a controles. Los estudios caso-control que exploran la posible asociación “SNP-fenotipo”, se basan principalmente en diseños de “candidate-genes” o genes candidatos y de “Genome Wide Association (GWAS)” o genotipado a gran escala.

### ***Estudios caso-control de genes candidatos***

Hasta aproximadamente una década, el abordaje más extendido para el estudio de SNPs asociados a una determinada enfermedad era el estudio de genes candidatos. Esta metodología consiste en seleccionar aquellos genes que podrían asociarse a una enfermedad basándose en la fisiopatología de ésta y en las rutas moleculares que se presupone que podrían tener alguna implicación en su etiología. Lo que se pretende es realizar un genotipado de SNPs representativos de bloques de haplotipo (conocidos como tagSNPs o SNPs etiqueta) que reflejen señales independientes y, mediante análisis estadísticos, determinar si existe alguna asociación entre las variantes genéticas y un determinado fenotipo clínico.

Sin embargo, este tipo de estudio presenta varias limitaciones. Por un lado, el seleccionar ciertos genes basándose en hipótesis generadas a priori, puede dar lugar a una inclinación del investigador a buscar diferencias basadas en sus ideas preconcebidas, detectando falsos positivos. Por otro lado, el hecho de limitarse a

unos pocos SNPs seleccionados a conciencia, conlleva el dejar de analizar posibles genes potencialmente implicados en la etiología de una enfermedad.

Debido a estas limitaciones, en la última década, los estudios de genotipado a gran escala han tomado protagonismo cobrando una gran importancia.

### ***Estudios de asociación de genoma completo (GWAS)***

El concepto de Genome-Wide Association Study (GWAS) fue formulado por primera vez por Risch y Merikangas [3]. Sin embargo, esta concepción metodológica comenzó a aplicarse a partir del año 2005. Un GWAS, a diferencia de los estudios de genes candidatos, evalúa un gran número de casos y controles mediante el estudio de cientos de miles de SNPs a lo largo de todo el genoma, utilizando arrays de alto rendimiento [4]. Una de las principales ventajas radica en que podemos explorar todo el genoma sin tener ningún conocimiento previo acerca de la posible implicación de ciertas regiones en la patogénesis de una enfermedad. Al igual que en los mencionados estudios de genes candidatos, lo que se pretende es analizar las frecuencias alélicas de cada una de estas variantes comunes y compararlas entre el grupo de casos y el grupo de controles, con la finalidad de detectar alelos o genotipos que están sobrerrepresentados en un grupo frente al otro. Los estudios mediante GWAS representan una forma mucho más exhaustiva de estudiar el genoma que los diseños de gen candidato, ya que al ser un enfoque libre de hipótesis, se evitan los sesgos de ideas preconcebidas.

El primer paso de un GWAS es la selección de un grupo caso-control apropiado. El diagnóstico preciso de los casos, a veces complejo dada la heterogeneidad clínica de las enfermedades, es un requisito para el éxito de un GWAS. Por otro lado, el tamaño muestral necesario para detectar asociaciones significativas debe ser del orden de miles de individuos.

Cabe señalar que el poder para detectar asociaciones para una determinada variante con una frecuencia alélica y un efecto particular, depende del número de casos y controles incluidos en el estudio. En teoría, cuanto mayor sea el tamaño muestral, más sensible es la identificación de variantes con efectos pequeños.

La selección de marcadores apropiados para el genotipadoes también fundamental. Los patrones de desequilibrio de ligamiento a lo largo del genoma humano permiten la selección de un subconjunto de marcadores informativos que captan la mayor parte de la variabilidad genética, lo que reduce los costes de genotipado [5]. Esto implica que el genotipado de unos cientos de miles de SNPs permite predecir mediante imputación el genotipo de más de un millón de variantes con alta confianza.

Después de realizar el experimento de genotipado, se aplican procedimientos estrictos de control de calidad para asegurar la exclusión de muestras y SNPs que podrían resultar en asociaciones falsas. Es importante comprobar la presencia de estratificación en la población de estudio, ya que a menudo el tipo de alelo de riesgo y las frecuencias alélicas difieren dependiendo de los orígenes étnicos ancestrales de cada individuo. Posteriormente, la asociación se lleva a cabo en un proceso llamado "Fase de descubrimiento", en la que se requiere ajustar por diferentes covariables. Debido a la gran cantidad de SNPs analizados, se deben aplicar penalizaciones estadísticas por comparaciones múltiples para evitar falsas asociaciones que podrían ocurrir por casualidad. Todo ello conlleva a establecer la significación en valores de  $p$  muy conservadores. La comunidad científica, ha establecido por consenso que el límite para la asociación significativa a nivel de GWAS debe ser de  $5 \times 10^{-8}$ . Por este motivo, para alcanzar la potencia estadística necesaria, los GWAS requieren aumentar significativamente el número de individuos analizados.

Finalmente, para la validación de los hallazgos, los SNPs que resultan significativos se genotipan en una segunda muestra independiente. Esta fase se denomina "Fase de replicación".

Una asociación estadísticamente significativa de un determinado marcador genético implica que o bien éste es la variante de riesgo, o bien está cerca de ella, es decir, el alelo para el que hemos encontrado la asociación puede estar directamente involucrado en la manifestación de la enfermedad o puede estar en desequilibrio de ligamiento con un alelo de susceptibilidad cercano. Con el fin de evaluar si los marcadores asociados a la enfermedad son realmente causantes o

son reflejo de las variantes causales, es común someter los loci asociados a la resecuenciación profunda y/o al mapeado detallado de la región [6].

Sin embargo, los GWAS también tienen algunas limitaciones. En primer lugar, estos enfoques metodológicos sólo son capaces de estudiar variantes comunes, es decir, aquellas que aparecen en la población general a una frecuencia superior al 1%. No están diseñados, y por tanto son ineficientes, a la hora de encontrar variantes raras que contribuyan a la enfermedad.

En segundo lugar, aunque los GWAS tienen la finalidad de dilucidar posibles nuevas vías implicadas en la patogénesis de una enfermedad, generalmente identifican loci no genes. Una señal positiva de un GWAS no siempre está dentro de la unidad funcional conocida de un gen. El principal problema que encierra el descubrimiento de variantes significativamente asociadas, es la interpretación del riesgo en el contexto de la patogénesis de la enfermedad. En la mayoría de las ocasiones, estas variantes son no codificantes, por lo que no está claro cuál es el gen diana y su consecuencia funcional.

A pesar del considerable éxito alcanzado hasta la fecha en el campo de la genética de las enfermedades complejas, se estima que la heredabilidad explicada por variantes comunes es en su mayoría desconocida [7]. Se espera que, en los próximos años, mega-meta-análisis de GWAS continúen detectando nuevas asociaciones. Además, es probable que podamos detectar nuevas asociaciones indagando en profundidad en los datos ya generados, y concretamente en las señales sub-significativas.

En la era post-genómica, los avances en genética serán posibles gracias a la cooperación y al espíritu colaborador de Consorcios Internacionales.

### ***Identificación de variantes raras asociadas a enfermedades complejas.***

#### ***Diferentes técnicas y abordajes***

Se ha hipotetizado que las variantes genéticas raras contribuyen a la etiología de las enfermedades complejas, generalmente exhibiendo efectos muy deletéreos. Estas variantes infrecuentes suelen ser las responsables de casos monogénicos

familiares y/o esporádicos de inicio temprano. No obstante, recientemente se ha especulado que una herencia oligogénica de variantes raras de pequeño efecto y por tanto poco agresivas, podría contribuir a formas esporádicas de inicio tardío de enfermedades complejas como la enfermedad de Parkinson [8].

Como se ha explicado anteriormente, una de las debilidades de los GWAS es que únicamente analizan variantes comunes y no contemplan las variantes infrecuentes (frecuencia poblacional  $< 1\%$ ), debido a restricciones en el tamaño muestral de individuos portadores de variantes tan poco comunes. Para la identificación de variantes raras que contribuyan al fenotipo clínico de una determinada enfermedad, los métodos de secuenciación y análisis de ligamiento resultan ser los más apropiados.

### ***Estudios mediante secuenciación***

La secuenciación del ADN en el laboratorio ha sido posible desde 1977, cuando el método Sanger (secuenciación de primera generación) se desarrolló por primera vez. Sin embargo, esta técnica sigue siendo demasiado laboriosa y costosa para la secuenciación rutinaria de múltiples genomas. En los últimos 10 años, una serie de nuevas tecnologías de última generación llamadas *next-generationsequencing* (secuenciación masiva paralela), han sustituido la secuenciación Sanger, reduciendo significativamente el coste y el tiempo requeridos para llevar a cabo el proceso. Sin embargo, la secuenciación Sanger todavía se utiliza para proyectos a menor escala, y para la validación de variantes detectadas por *next-generationsequencing*.

En rasgos generales, el procedimiento experimental y analítico implica los siguientes pasos. En primer lugar, el ADN se fragmenta por métodos mecánicos o enzimáticos. A continuación, se añaden adaptadores específicos a ambos extremos de cada fragmento de interés, con la finalidad de amplificarse fácilmente empleando únicamente un par de cebadores, o a través de hibridación con una superficie con adaptadores complementarios. Posteriormente, se origina la secuenciación masiva paralela de ADN que produce miles de millones de señales fluorescentes. Por último, un software de detección traduce las intensidades de señal de luz en las bases que componen el ADN. Finalmente, los datos generados,

se procesan mediante un análisis complejo que requiere una gran experiencia bioinformática.

El primer paso del análisis bioinformático es la alineación del genoma secuenciado con un conjunto de genomas de referencia. En segundo lugar, la alineación de genomas permite, por comparación, obtener una lista de variantes presentes en nuestro genoma de estudio a través de un proceso denominado “variantcalling”. Posteriormente, todas las variantes identificadas se asocian con diversas informaciones descriptivas, tales como el nombre del gen en el que se localiza la variante y su posición exacta en el genoma, en un proceso denominado “variantannotation” [9].

A continuación, para explorar una posible implicación en la enfermedad, resulta fundamental estudiar la frecuencia de las variantes identificadas en bases de datos de población general. La interpretación de los resultados constituye uno de los mayores desafíos del análisis, por lo que es necesario llevar a cabo una estrategia de filtrado de múltiples etapas para excluir variantes benignas e irrelevantes. Inicialmente, los datos se comparan con bases de datos públicas como dbSNP, 1000Genome Project, ExomeVariant Server, ExomeAggregationConsortium y HapMap, entre otras, para eliminar todas las variantes comunes (frecuencias alélicas > 1-5%), que se encuentran presentes en la población general y no tendrán un efecto muy deletéreo. Es probable que las bases de datos muy grandes puedan incluir alelos patógenos presentes en la población general, pero este sesgo es imposible de controlar.

Un claro ejemplo reside en aquellos individuos portadores de mutaciones que son demasiado jóvenes para expresar la enfermedad, o en aquellos que no presentan síntomas debido a la penetrancia incompleta de ciertas variantes patogénicas, así como los que presentan un fenotipo aparentemente no detectable. Estos individuos pueden ser secuenciados y sus datos depositados erróneamente en paneles de referencia. Este hecho puede generar el problema de descartar variantes genéticas patogénicas [10].

Dentro del proceso de filtrado, resulta fundamental excluir aquellas variantes que no alteran la secuencia de aminoácidos, no encajan con el modo de herencia de

la enfermedad (autosómico dominante o recesivo), o no se segregan entre los individuos afectados de una determinada familia. Una vez se dispone de una lista reducida de posibles variantes, es importante tener en cuenta criterios adicionales. Por ejemplo, es útil explorar el posible daño funcional generado por el aminoácido mutado utilizando herramientas *in silico*. Las predicciones funcionales deben ser evaluadas usando varias herramientas diferentes y deben tomarse con precaución, ya que a veces podrían no ser muy precisas.

Una opción adicional es analizar la conservación evolutiva del nucleótido o aminoácido diana. Se piensa que los nucleótidos altamente conservados son muy relevantes para la función de la proteína, ya que las variantes deletéreas tienden a ser eliminadas por selección natural. Otra cuestión importante es que la supuesta variante causante de la enfermedad, debe estar ausente en la población control de la misma etnia, y la misma variante u otras mutaciones en el mismo gen deben encontrarse en pacientes independientes o familias con fenotipo similar. Además, si se sabe que el gen se expresa en el órgano/s que se ven afectados en la enfermedad, y además tiene un papel reconocido en una vía implicada en la patología de estudio, suele ser suficiente para confirmar que la variante está potencialmente asociada a la enfermedad. Sin embargo, no es posible atribuir un papel patogénico únicamente sobre la base de estos hallazgos. Los estudios funcionales, llevados a cabo en modelos *in vitro* e *in vivo*, son siempre necesarios para confirmar su función patológica.

Entre las distintas formas de estudiar el genoma mediante secuenciación, el presente capítulo abordará con detalle los procesos de secuenciación completa del exoma (*whole-exomesequencing*) y la secuenciación completa del genoma (*whole-genomesequencing*), ofreciendo una visión general sobre sus ventajas e inconvenientes con respecto a la secuenciación convencional.

### ***Secuenciación completa del exomaversus. Secuenciación completa del genoma***

La secuenciación completa del exoma es un método de secuenciación de última generación que tiene como finalidad determinar la variabilidad genética de todas las regiones codificantes de genes conocidos. Se estima que alrededor del 85% de las mutaciones causantes de las enfermedades se localizan en regiones codificantes y funcionales del genoma [11]. Secuenciar todo el exoma tiene el potencial de descubrir las causas de trastornos raros y monogénicos cuando los individuos disponibles para el estudio son pocos. Más recientemente, también se está utilizando para explorar tipos de variantes genéticas en función de su frecuencia (raras, intermedias y comunes) en estudios de casos y controles a gran escala [12].

Una de las principales ventajas de la secuenciación exómica es que permite condensar el tiempo necesario para la identificación de nuevas mutaciones de años a semanas, lo que hace posible aumentar el número de muestras a secuenciar, permitiendo grandes comparaciones basadas en la población. También reduce los costes de secuencia y almacenamiento, y permite analizar una región determinada con alta profundidad y cobertura.

Sin embargo, también hay ciertas limitaciones que deben ser consideradas. La secuenciación completa del exoma, se centra en tan sólo alrededor del 1% del genoma y se limita a variantes presentes en regiones codificantes y en regiones *de splicing*. Además, la tecnología actual no permite detectar con una fiabilidad absoluta todas las regiones que codifican a proteínas a lo largo de todo el genoma. Por ejemplo, regiones ricas en GC y homopolímeros (grandes repeticiones del mismo nucleótido) son difíciles de secuenciar. Además, grandes deleciones, duplicaciones y reorganizaciones genómicas, pueden ser obviadas fácilmente debido a las limitaciones de la longitud de lectura de la tecnología actual. En ocasiones puede ocurrir que la captura del exoma origine sesgos dando falsos positivos y negativos. Una forma de reducir esta limitación es aumentar la profundidad de cobertura de la reacción de secuenciación, lo que implica mayores costes de en el procedimiento.

Por otra parte, la secuenciación completa del genoma se emplea para investigar variantes tanto en el 1% del genoma que codifica a proteínas, como en el

99% de las secuencias restantes no codificantes. Todo ello permite examinar SNPs y mutaciones, grandes inserciones, duplicaciones y deleciones en las regiones codificantes y no codificantes del genoma, así como en regiones reguladoras tales como promotores. Además, la secuenciación completa del genoma tiene más cobertura y es más fiable, ya que la amplificación por PCR no es necesaria para la generación de las librerías, reduciendo el sesgo de la falta de identificación de regiones ricas en GC. Además, la longitud de lectura no es una limitación, por lo tanto, grandes deleciones, duplicaciones y reordenamientos pueden ser detectados.

La secuenciación completa del genoma está generando grandes expectativas, sin embargo tiene una limitación importante. El coste es considerable no sólo para el procedimiento de secuenciación, sino también para el almacenamiento de datos. Además, la interpretación de tal cantidad masiva de datos constituye un gran reto. Por el momento, la secuenciación del exoma completo, es una "alternativa temporal" para estudiar la genética de enfermedades complejas. No obstante, en el futuro se prevee que realizaremos análisis de secuenciación de genoma completo a gran escala y que éstos tendrán un impacto científico sin precedentes.

### ***Análisis de ligamiento***

Históricamente, el análisis de ligamiento fue el principal instrumento utilizado para el mapeo de rasgos mendelianos y complejos con agregación familiar [13]. Cuando muestras biológicas de varios individuos afectados de la misma familia están disponibles, la región genómica de interés puede ser investigada mediante la exploración de la segregación familiar a través de ciertos marcadores genéticos. La identificación del locus asociado a la enfermedad y de los pocos genes localizados dentro de dicho locus, es relativamente sencillo cuando la penetrancia es completa. Lo que se calcula es la probabilidad de que un determinado locus, segregue con la enfermedad.

Hoy en día, el análisis de ligamiento vuelve a resurgir como un método muy útil para elucidar la base genética de enfermedades complejas, particularmente

para la identificación de variantes raras asociadas a un rasgo con alta penetrancia. Este enfoque metodológico tiene muchas ventajas en comparación con los métodos de secuenciación. En primer lugar, limita el número de genes que tienen que ser analizados. Además, también tiene en cuenta posibles fenocopias y penetrancia reducida. Sin embargo, el análisis de ligamiento no puede detectar adecuadamente regiones con un efecto reducido sobre la enfermedad y requiere un número considerable de individuos afectados en una determinada familia. En la actualidad, varios nuevos genes de susceptibilidad se han identificado utilizando el análisis de ligamiento acoplado a la secuenciación de genoma completo [14]. La combinación de ambas estrategias metodológicas se piensa que será el método estrella para el descubrimiento genético en el futuro próximo.

### ***Conclusiones y perspectivas futuras***

Comprender los mecanismos patogénicos asociados a una enfermedad, depende principalmente de encontrar el gen o locus implicado y las variantes asociadas a él. El estudio de las bases genéticas de una determinada enfermedad contribuye no sólo a un mejor conocimiento sobre su etiología, sino que además permite identificar a los individuos en riesgo de desarrollarla y diseñar estrategias terapéuticas para la cura y la prevención. El campo de la genética de las enfermedades complejas se encuentra en un período de rápido descubrimiento, gracias al advenimiento de las denominadas tecnologías de secuenciación masiva y de genotipado a gran escala. Estos importantes avances, han facilitado el estudio de genomas humanos a una velocidad sin precedentes y a un coste cada vez menos elevado.

Actualmente estas tecnologías están en proceso de perfeccionamiento, y es necesario consensuar la mejor manera de manejar estadísticamente las cantidades tan masivas de datos que generan estos análisis. Sin embargo, en un futuro cercano se estima que el potencial que encierran estas nuevas concepciones metodológicas, permita desentramar en su totalidad la arquitectura genética de las enfermedades complejas.

Un estudio exhaustivo de las bases genéticas de las enfermedades complejas, será posible gracias a las colaboraciones entre distintos centros, especialmente a través de la creación de Consorcios estables. Los grandes Consorcios Internacionales, mediante el fomento del espíritu colaborativo, están aportando nueva luz en el esclarecimiento del origen de un gran número de enfermedades complejas. Hoy en día, esta estrategia es imprescindible a la hora de llevar a cabo investigación de alta calidad científica que puedan traducirse en un futuro beneficio para la sociedad.

### ***Bibliografía***

1. Reich DE, Lander ES. (2001). On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet.* 17, 502–510.
2. Pittman A, Hardy J. (2013). Genetic analysis in neurology: the next 10 years. *JAMA Neurol* 70, 696–702.
3. Risch N, Merikangas K. (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273, 1516–1517.
4. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JPA, Hirschhorn JN. (2008). Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 9, 356–369.
5. Singleton AB, Hardy J, Traynor BJ, Houlden H. (2010). Towards a complete resolution of the genetic architecture of disease. *Trends Genet.* 26, 438–442.
6. Balding DJ. (2006). A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat. Rev. Genet.* 7, 781–791.

7. Singleton A, Hardy J. (2016). The Evolution of Genetics: Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Neuron* 90, 1154–1163.
8. Lubbe SJ, Escott-Price V, Gibbs JR, Nalls MA, Bras J, Price TR, Nicolas A, Jansen IE, Mok KY, Pittman AM, Tomkins JE, Lewis PA, Noyce AJ, Lesage S, Sharma M, Schiff ER, Levine AP, Brice A, Gasser T, Hardy J, Heutink P, Wood NW, Singleton AB, Williams NM, Morris HR. for International Parkinson's Disease Genomics Consortium (2016). Additional rare variant analysis in Parkinson's disease cases with and without known pathogenic mutations: evidence for oligogenic inheritance. *Hum. Mol. Genet.*
9. Olgiati S, Quadri M, Bonifati V. (2016). Genetics of movement disorders in the next-generation sequencing era. *Mov. Disord.* 31, 458–470.
10. Singleton AB. (2011). Exome sequencing: a transformative technology. *Lancet Neurol* 10, 942–946.
11. Rabbani B, Tekin M, Mahdih N. (2014). The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J. Hum. Genet.* 59, 5–15.
12. Price AL, Zaitlen NA, Reich D, Patterson N. (2010). New approaches to population stratification in genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* 11, 459–463.
13. Simón-Sánchez J, Singleton A. (2008). Genome-wide association studies in neurological disorders. *Lancet Neurol* 7, 1067–1072.
14. Ott J, Wang J, Leal SM. (2015). Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 16, 275–284.



## Genetic association study of Parkinson's disease related-loci in Southern Spain

**Bandrés-Ciga S, Duran R, Barrero FJ, Escamilla-Sevilla F, Pelegrina J, Medina JA, Ching-López A, Cervilla J, Gutiérrez B, Vives F**

### Abstract

It has been widely suggested that genetic factors contribute to the complex pathogenesis of Parkinson's disease (PD). Our aim was to perform a case-control association study by assessing 64 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 113 individuals with PD and 374 controls from Southern Spain. SNPs were selected from the following PD-related loci (*SNCA*, *LRRK2*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ-1*, *VPS35*, *MAPT*, *GBA*, *HLA*, *STK39*, *ACMSD*, *GAK*). Genotyping was carried out using Taqman assays in an OpenArray Real-Time PCR platform. Logistic regression and haplotype analyses were performed assuming an additive model to test association with PD. Our study revealed significant differences (adjusted significance threshold:  $p=1 \times 10^{-3}$ ) for the following SNPs: *SNCA* rs2736990-G (OR=1.8, 95% CI [1.3-2.5],  $p=1 \times 10^{-4}$ ) and *SNCA* rs356204-T (OR=1.7, 95% CI [1.3-2.3],  $p=3 \times 10^{-4}$ ). *GBA* haplotypes TTGG and CCAA (rs2990245-rs2049805-rs914615-rs206698), and the *SNCA* haplotype TGGT (rs356204-rs356219-rs2736990-rs356220) were found to be significantly overrepresented in cases (*GBA*-TTGG; OR= 2.6, 95% CI [1.1-6.3],  $p= 4.1 \times 10^{-11}$ ; *GBA*-CCAA; OR= 7.7, 95% CI [2-29.3],  $p= 1.2 \times 10^{-8}$ ),

(*SNCA*-TGGT; OR=1.4, 95% CI [1-2],  $p= 6 \times 10^{-4}$ ). In conclusion, common SNPs in the *SNCA* and *GBA* loci are risk factors for idiopathic PD in the Southern Spanish population.

## ***Introduction***

Although the aetiology of Parkinson's disease (PD) still remains unclear, approximately 5-10% of the patients are known to have monogenic forms of the disease. To date, a considerable number of genes have been associated with both autosomal dominant and autosomal recessive PD [1]. However, these cannot explain the aetiology of the vast majority of patients with an apparently sporadic PD which is thought to result from complex interactions between genes and environmental factors. Recently, several genome-wide association studies (GWASs) [2-8] and large scale meta-analyses [9-14] have provided new insight into the genetic landscape of PD identifying a number of susceptibility loci considered as risk factors. However, replication studies in independent populations are absolutely necessary to test the robustness of such association reports. It has been widely suggested that studies in populations with limited genetic heterogeneity are valuable for studying the genetic basis of disease [3].

Here we perform a case-control association study to examine the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the most significant loci reported in recent GWAS and the risk of developing PD in a representative and homogeneous sample from Southern Spain. Moreover, we establish haplotype analysis to evaluate cumulative effects of multiple SNPs within the same haplotype.

## ***Material and Methods***

### **▪ Subjects**

The study population consisted of 113 PD patients from Southern Spain recruited in the Movement Disorder Unit of the University Clinical Hospital "San Cecilio" and the Hospital "Virgen de las Nieves" from Granada (Spain) and 374 healthy subjects from the same region with no family history of PD. The recruitment of the whole sample was held between 2006 and 2012. PD was diagnosed by at least two expert neurologists in the field of movement disorders under the criteria of the UK PD Society Brain Bank [15]. Controls were extensively assessed to rule out any sign of

neurological or psychiatric condition, and cognitive impairment was evaluated using the scale “Screen for Cognitive Impairment in Psychiatry (SCIP)”. Studies comparing cognitively-impaired individuals to those with adequate functioning propose a cut-off point of the SCIP at 70, what is associated with a sensitivity of 87.9 and specificity of 80.6 [16]. None of our control subjects showed cognitive deterioration. This study was approved by the local ethic committee and written informed consent was taken from each participant.

- **SNPs selection and Genotyping process**

64 SNPs were selected from recent reported GWAS or candidate studies in PD-related genes/loci. Genomic DNA was isolated and purified from peripheral blood leucocytes or saliva following manufacturer’s protocols (QIAamp DNA Blood Midi Kit, QIAGEN; Oragene Kit, DNA Genotek). DNA quantification and quality control tests were carried out using Nanodrop. Genotyping of selected SNPs was performed using TaqManOpenArray technology (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and subsequent allele assignation using the software Taqmangenotyper v1.2 (Thermo Fisher Scientific). To guarantee the genotyping quality, each array included negative controls. Stringent quality control criteria were applied to both SNP and individual data using PLINK 1.07 [17]. SNPs were excluded if they had a missing genotype rate > 10 % or showed departure from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ( $p < 0.01$ ). Individuals with genotypic data showing a missing rate > 10 % were also excluded for subsequent analysis. After quality control procedures, 60 SNPs and 487 individuals were finally included in the study.

- **Statistical analysis**

Each SNP was assessed for HWE in patients and controls separately by using PLINK 1.07. The same statistical package was used to test the association between PD and the genotyping data by a logistic regression assuming an additive model adjusted by sex and age. The number of effective-independent tests performed was calculated with the single nucleotide polymorphism spectral decomposition (SNPSpD) method.

This method corrects for non-independence of SNPs in linkage disequilibrium (LD) with each other [18]. The effective number of independent marker loci was 41, and the experiment-wide significance threshold required to keep type I error rate at 5 % was  $1 \times 10^{-3}$ .

Since a small number of SNPs were tested, adjusting for cryptic relatedness was not possible. However, we studied thoroughly every subject included in the study and removed individuals from the same family, when applied. Because the whole-genome genotype data was not available for cases and controls, adjusting for population sub-stratification could not be performed. Although we assume this limitation, only Caucasian reported ancestry was taken into account such inclusion criteria.

In addition to test each SNP individually by a case-control association analysis, we evaluated cumulative effects of multiple SNPs within the same haplotype ( $r^2 > 0.8$ ), by collapsing its effects through haplotype analyses. We estimated the haplotype frequencies with the standard expectation-maximization algorithm and performed tests of association based on the distribution of probabilistically inferred set of haplotypes in cases versus controls. Haplotype-specific odds ratio (OR) and 95 % CI was calculated. Statistical significance was set at  $p < 0.05$  for haplotype association analysis.

## **Results**

Information on demographic characteristics and clinical data is summarized in Table 1. None variants deviated significantly from HWE in both groups under study. SNPs in LD ( $r^2 > 0.8$ ) are summarized in Table 2.

Two out of the sixty-four SNPs analyzed were significantly associated with PD after adjustment (Table 3). We showed that rs2736990 and rs356204 in the *SNCA* locus were related to risk for PD. A trend towards association was detected for *SNCA* rs356219, a tagging SNP in LD with the last two variants of the *SNCA* gene, and for the intronic *ACMSD* rs2166480 variant. We could not establish any other association with PD for the remaining tested variants. Although rs28903073 (*LRRK2*), rs11248051 (*GAK*), rs356220 (*SNCA*), rs1564282 (*GAK*) and rs6749447 (*STK39*)

were significantly associated with PD in our unadjusted model, they did not surpass the stringent threshold.

Haplotype analyses identified the *GBA* haplotypes TTGG and CCAA (rs2990245-rs2049805-rs914615-rs206698) to be significantly overrepresented in PD cases versus controls (*GBA*- TTGG; OR= 2.6, 95% CI [1.1-6.3],  $p= 4.1 \times 10^{-11}$ ; *GBA*- CCAA; OR= 7.7, 95% CI [2-29.3],  $p=1.2 \times 10^{-8}$ ) Similarly, the *SNCA* haplotype TGGT (rs356204-rs356219-rs2736990-rs356220) was found to increase significantly the risk for PD in our cohort (OR=1.4, 95% CI [1- 2],  $p= 6 \times 10^{-4}$ ) (Table 4).

This cohort was previously sequenced for the *GBA* exons 8-11, identifying a total of 5 different pathogenic mutations among 19 patients [19]. We performed extra analyses to explore the relationship between the occurrence of *GBA* mutations N370S, E326K, T369M, L444P, D409H and the two *GBA* risk haplotypes (TTGG and CCAA) reported in the current work. Our results showed that the two *GBA* risk haplotypes are not overrepresented in *GBA* mutation carriers in comparison with non-carriers (TTGG:  $\chi^2 = 1.5$ ,  $p = 0.21$ ; CCAA:  $\chi^2 = 0.24$ ,  $p = 0.62$ ).

## **Discussion**

The year 1997 marked the starting point for PD genetics with the discovery of pathogenic mutations in *SNCA*, encoding  $\alpha$ -synuclein. Soon after,  $\alpha$ -synuclein was identified as the major component of Lewy Bodies and the main pathological hallmark of both familial and idiopathic PD [20].

Interestingly, *SNCA* is a pleomorphic locus. On one side, deleterious point mutations as well as duplications and triplications in this gene cause a very severe early onset form of PD with an autosomal dominant pattern of inheritance [21-24]. On the other side, it has been widely demonstrated that non-coding variability within this locus confers risk and predisposes to idiopathic PD. The first indication that *SNCA* contained risk variants for idiopathic PD, came from the association between the REP1 polymorphism in the promoter region of the gene and PD [25]. This region is thought to influence gene transcription in both cell lines and *in vivo* models [26, 27]. Subsequently, two independent GWAS performed in Caucasian and

Asian populations revealed a significant association of SNPs in intron 4 and the 3'untranslated region of *SNCA*, and PD risk [6, 7]. Therefore, it is assumed that there are at least two distinct and independent regions at the *SNCA* locus that contain common variants altering risk for disease.

Recently, several meta-analysis of GWAS with larger patient-control cohorts, have undoubtedly tested such associations [2-8], and our case-control study also confirms these findings, providing strong support for the susceptibility role of *SNCA* in individuals affected with PD from Southern Spain.

We found an association between rs2736990 and rs356204, both in the intron 4 of *SNCA*, and PD pathogenesis. Similarly, previous studies showed that rs2736990-G allele increases the risk for PD in Caucasian and Japanese populations [2, 7, 28]. In concordance with the literature, *SNCA* rs356204-T allele was also linked to PD [29]. Although this non-coding SNP only showed a trend toward significance in our study, it has been associated with PD in two previous case-control studies conducted in Norway [30], USA [31], and in a large multicentre case-control study [32]. Moreover, when evaluated cumulative effects of multiple SNPs within the same *SNCA* haplotype, we also found an increasing risk for PD in the TGGT haplotype carriers.

As documented above, we could not establish any other association between the remaining SNPs and PD since they did not surpassed our stringent adjustment. We are confident that the signals we detected as significant in an unadjusted model might represent a true association with PD. As these loci are PD confirmed risk factors and our cohort under study is homogeneous, the adjusted threshold could have underestimated our results. In fact, haplotype analyses combining dependent effects of variants in LD revealed association with PD at the *GBA* locus, which could not be detected when focusing on single independent effects.

*GBA* encodes the lysosomal enzyme glucocerebrosidase. The interest in *GBA* as a causative factor for PD started after clinical observations in the 1990s of heterozygous *GBA* carriers who developed parkinsonian symptoms [33]. It has been shown that approximately 5-10% of PD patients carry a genetic risk variant in *GBA*, and current data suggest that heterozygote states confer a cumulative risk of developing PD of up to 30% by age 80 years [34], being the most important genetic

predisposing risk factor for the development of PD identified to date. *GBA* carriers exhibit an autosomal-dominant pattern of inheritance with incomplete penetrance and its prevalence varies among populations.

The present study identified two risk haplotypes at this locus. However, we did not find differences after examining the proportion of the two significant *GBA* risk haplotypes between *GBA* carriers of mutations N370S, E326K, T369M, L444P, D409H and non-carriers. Our results suggest that these two haplotypes confer PD risk independently to the occurrence of carrying certain *GBA* mutations.

Several mechanisms correlate *GBA* and *SNCA* with PD pathogenesis. It seems that loss of glucocerebrosidase activity results in glucosylceramide accumulation, decreased lysosomal degradation and subsequent accumulation of  $\alpha$ -synuclein, which in turn impairs glucocerebrosidase trafficking from endoplasmic reticulum and Golgi to lysosomes [35]. This positive feedback loop was proposed to lead to neurodegeneration in PD through a loss-of-function mechanism. However, overexpression of several *GBA* mutants in cultured cell lines also resulted in  $\alpha$ -synuclein accumulation, suggesting a gain-of-function mechanism [36].

According to these findings, genetic defects in *SNCA* and *GBA* are involved on neurodegeneration also in PD patients from Southern Spain. We stress the importance of developing neuroprotective and disease-modifying therapeutic strategies aimed at restoring protein impaired metabolism and lysosomal activity in PD.

## **Conclusions**

In conclusion, our report represents a case-control assessment of the Southern Spanish population in PD genetics. We replicate the association of common variants at the *GBA* and *SNCA* loci with PD etiology, reinforcing the previous notion that both loci play a key role in the genetic susceptibility for idiopathic PD.

### ***Acknowledgments***

We would like to thank the patients and controls for their participation in this study. It was supported by the following grants from the Junta de Andalucía; PI0322/2009 to the group CTS-6682; CVI-6476, PSI2014-57643 to the CTS-438 group, and a research award from the Andalusian Society of Neurology. S.B. held a FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science.

### ***Abbreviations***

**PD:** Parkinson's disease, **SNP:** Single nucleotide polymorphism, **SNCA:** alpha-synuclein, **LRRK2:** leucine-rich repeat kinase 2, **PARK2:** E3 Ubiquitin Protein Ligase, **PINK1:** PTEN Induced Putative Kinase 1, **DJ-1:** DJ-1 protein, **VPS35:** Retromer Complex Component, **MAPT:** Microtubule-Associated Protein Tau, **GBA:** Glucocerebrosidase, **STK39:** serine/threonine kinase 39, **ACMSD:** Aminocarboxymuconate Semialdehyde Decarboxylase, **GAK:** Cyclin G Associated Kinase. **SCIP:** Screen for Cognitive Impairment in Psychiatry, **HWE:** Hardy-Weinberg equilibrium, **SNPspD:** single nucleotide polymorphism spectral decomposition, **LD:** Linkage disequilibrium

### ***Ethics approval and consent to participate***

The study was approved by the local Ethics Committee of the Hospital Clínico San Cecilio and Hospital Virgen de las Nieves (Granada). The investigation was conducted in accordance with the humane and ethical research principles of the Declaration of Helsinki. All participants completed a questionnaire and informed consent that has been approved by the ethics committee.

**Table 1: Demographic and clinical characteristics of the individuals under study**

	<b>Cases</b>	<b>Controls</b>
<b>Age</b>	61.19 ± 12	60.1 ± 11.6
<b>Female:Male</b>	43 :70	154:220

<b>H&amp;Y score</b>	<b>n (%)</b>	<b>F:M</b>	<b>AAO</b>	<b>DD</b>
<b>I</b>	29(25.6)	10:19	62.38±12.12	35.34±29.8
<b>II</b>	50(44.3)	20:30	63.84±9.99	52.14±41.34
<b>III</b>	28(24.8)	9:19	55.58±11.90	126.85±86.77
<b>IV</b>	6(5.3)	4:02	59.50±15.41	153.17±120.4
				0

F:M: Female, Male. AAO: Age at onset, DD: Disease duration (months), H&Y: Hoehn and Yahr score (index of disease severity).

**Table 2: SNPs under linkage disequilibrium (LD)**

			Distance	Rsquare	DPrime
<b>SNCA</b>	rs356204	rs2736990	14999	1.000	1.000
	rs356220	rs356219	3739	1.000	1.000
	rs3857052	rs11931074	4342	1.000	1.000
	rs7684318	rs3857052	11146	1.000	1.000
	rs7684318	rs11931074	15488	1.000	1.000
<b>GAK</b>	rs11248051	rs1564282	6019	1.000	1.000
<b>GBAP1;GBA</b>	rs2990245	rs2049805	2482	1.000	1.000
	rs2990245	rs914615	21570	0.872	1.000
	rs2990245	rs2066981	25083	0.842	1.000
	rs914615	rs2066981	3513	0.966	1.000
	rs914615	rs2049805	19088	0.872	1.000
	rs2066981	rs2049805	22601	0.842	1.000
<b>LRRK2</b>	rs10784522	rs10878405	1889	0.965	1.000
<b>GBA;FAM189B</b>	rs11264345	rs9628662	6783	1.000	1.000
	rs11264345	rs1045253	11889	0.928	1.000
	rs9628662	rs1045253	5106	0.928	1.000
<b>PARK2</b>	rs17573347	rs17651866	8681	1.000	1.000

**Table 3: Results of association analysis of the top SNPs and PD**

CHR	SNP	Gene	BP	A1/A2	OR (95%CI)	L95	U95	p-add (UNADJ)	Cases	Controls
*4	rs2736990	SNCA	40653510	A/G	1.85	1.35	2.56	0.0001491	0.5825	0.4234
*4	rs356204	SNCA	90663542	T/C	1.75	1.29	2.39	0.0003334	0.5664	0.4236
4	rs356219	SNCA	90637601	G/A	1.8	1.26	2.57	0.001148	0.48	0.3259
2	rs2166480	ACMSD	135637338	G/A	1.69	1.23	2.33	0.001317	0.455	0.3425
12	rs28903073	LRRK2	90678541	G/A	10.16	2.11	53.80	0.004209	0.02703	0.002695
4	rs11248051	GAK	858332	T/C	1.9	1.18	3.09	0.00889	0.1339	0.07609
4	rs356220	SNCA	90641340	T/C	1.52	1.16	3.01	0.01588	0.4545	0.3411
4	rs1564282	GAK	852313	T/C	1.86	1.08	2.15	0.01027	0.1372	0.07995
2	rs6749447	STK39	169041386	G/T	1.369	0.99	1.89	0.05896	0.3839	0.3147

CHR: Chromosome, SNP: Single nucleotide polymorphism, BP: Base pair position, A1/A2: Alleles, OR: Odds ratio, 95%CI: 95% Confidence interval, L95, U95: lower/upper intervals, p-add (UNADJ): unadjusted p value under an additive model.

\* SNPs significantly associated with PD after adjustment for the SNP spectral decomposition method, \*\* OR values refer to Allele A1.

**Table 4: Estimated *SNCA/GBA* haplotype frequencies in cases and controls**

Locus	Haplotype	F_A	F_U	OR	CI	p-value	SNPs
<i>SNCA</i>	TGGT	0.45	0.32	1,4	(1-2)	0.0006	A
<i>GBA</i>	TTGG	0.08	3.2E-02	2.6	(1.1-6.3)	4,1E-11	B
	CCAA	0.06	1.4E-02	7.7	(2-29.3)	1,2E-08	C

F\_A: Freq in cases; F\_U: Freq in controls; OR: Odds ratio; 95 % CI: 95 % Confidence Interval; SNPs: Single nucleotide polymorphisms forming the different haplotypes. A: rs356204, rs356219, rs2736990, rs356220; B: rs2990245, rs2049805, rs914615, rs2066981; C: rs2990245, rs2049805, rs914615, rs2066981

## References

1. Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V. (2003). The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Movement Disorders*. 28: 14–23.
2. Edwards TL, Scott WK, Almonte C et al. (2010). Genome-wide association study confirms SNPs in *SNCA* and the *MAPT* region as common risk factors for Parkinson disease. *Annals of Human Genetics*. 74: 97–109.
3. Hernandez DG, Nalls MA, Ylikotila P et al. (2012). Genome wide assessment of young onset Parkinson's disease from Finland. *PLoS ONE*. 7: e41859, 2012.

4. Pihlstrøm L, Axelsson G, Bjørnarå KA et al. (2013). Supportive evidence for 11 loci from genome-wide association studies in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*. 34: e7–13, 2013.
5. Saad M, Lesage S, Saint-Pierre A et al. (2011). Genome-wide association study confirms BST1 and suggests a locus on 12q24 as the risk loci for Parkinson's disease in the European population. *Human Molecular Genetics*. 20: 615–627.
6. Satake W, Nakabayashi Y, Mizutaet I al. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature Genetics*. 41: 1303–1307.
7. Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM et al. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature Genetics*. 41: 1308–1312.
8. Simón-Sánchez J, van Hilten J, van de Warrenburg B et al. (2011). Genome-wide association study confirms extant PD risk loci among the Dutch. *European Journal of Human Genetics*. 19: 655–661.
9. Nalls M, Pankratz N, Lill C et al. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nature Genetics*. 46: 989–993.
10. Nalls MA, Plagnol V et al. (2011). International Parkinson Disease Genomics Consortium, Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet*. 377: 641–649.

11. Do C, Tung J, Dorfman E et al. (2011). Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson's disease. *PLoS Genetics*. 7: e1002141.
12. International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC) and Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2). (2011). A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease. *PLoS Genetics*.7: e1002142.
13. Lill CM, Roehr JT, McQueen MB et al. (2012). Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genetics*.8: e1002548.
14. Pankratz N, Beecham GW, DeStefano AL et al. (2012). Meta-analysis of Parkinson's disease: identification of a novel locus, RIT2. *Annals of Neurology*. 71: 370–384.
15. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L et al. (1992). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 55: 181–184.
16. Pino O, Guilera G, Rojo JE et al. (2008). Spanish version of the Screen for Cognitive Impairment in Psychiatry (SCIP-S): psychometric properties of a brief scale for cognitive evaluation in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 99: 139–148.

17. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*. 81: 559–575.
18. Nyholt D. (2004). A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *American Journal of Human Genetics*. 74: 765–769.
19. Bandrés-Ciga S, Mencacci ME, Duran R et al. (2016). Analysis of the genetic variability in Parkinson's disease from Southern Spain. *Neurobiology of Aging*. 37: 210.
20. Spillantini M, Schmidt M, Lee V et al. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 388: 839–840.
21. Krüger R, Kuhn W, Müller T et al. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics*. 18: 106–108.
22. Zarranz J, Alegre J, Gómez-Esteban J et al. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology*. 55: 164–173.
23. Chartier-Harlin M, Kachergus J, Roumier C et al. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*. 364: 1167–1169.
24. Singleton A, Farrer M, Johnson J et al. (2003). Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 302: 841.

25. Krüger R, Vieira-Saecker AM, Kuhn W et al. (1999). Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype. *Annals of Neurology*. 45: 611–617.
26. Chiba-Falek O, Kowalak J, Smulson M et al. (2005). Regulation of alpha-synuclein expression by poly (ADP ribose) polymerase-1 (PARP-1) binding to the NACP-Rep1 polymorphic site upstream of the SNCA gene. *American Journal of Human Genetics*. 76: 478–492.
27. Cronin K, Ge D, Manninger P et al. (2009). Expansion of the Parkinson disease-associated SNCA-Rep1 allele upregulates human alpha-synuclein in transgenic mouse brain. *Human Molecular Genetics*. 18: 3274–3285.
28. Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W et al. (2012). SNCA polymorphisms, smoking, and sporadic Parkinson's disease in Japanese. *Parkinsonism and Related Disorders*. 18: 557–561.
29. Westerlund M, Belin AC, Anvret A et al. (2008). Cerebellar alpha-synuclein levels are decreased in Parkinson's disease and do not correlate with SNCA polymorphisms associated with disease in a Swedish material. *FASEB Journal*. 22: 3509–3514.
30. Myhre R, Toft M, Kachergus J et al. (2008). Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population. *Acta Neurologica Scandinavica*. 118: 320–327.

31. Mata IF, Shi M, Agarwal P et al. (2010). SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Archives of Neurology*. 67: 1350–1356.
32. Elbaz A, Ross OA, Ioannidis JP et al. (2011). Independent and joint effects of the MAPT and SNCA genes in Parkinson disease. *Annals of Neurology*. 69: 778–792.
33. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D et al. (1996). Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. 89: 691–694.
34. McNeill A A, Duran R, Hughes D et al. (2012). A clinical and family history study of Parkinson's disease in heterozygous glucocerebrosidase mutation carriers. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 83: 853–854.
35. Mazzulli J, Xu Y, Sun Y et al. (2012). Gaucher disease glucocerebrosidase and  $\alpha$ -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*. 146: 37–52.
36. Cullen V, Sardi S, Ng J et al. (2011). Acid  $\beta$ -glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter  $\alpha$ -synuclein processing. *Annals of Neurology*. 69: 940–953.



## CAPÍTULO 5

# Evaluación y seguimiento mediante electrorretinografía multifocal de pacientes con cese del tratamiento con hidroxicloroquina

Ruiz-Ortega J, Sáez-Moreno JA, Rodríguez-Ferrer JM

### Resumen

**Introducción.** La toxicidad por hidroxicloroquina (HCQ) se caracteriza por una maculopatía bilateral con escotomas paracentrales y que, en el examen fundoscópico, presenta un característico anillo de despigmentación del epitelio pigmentario de la retina parafoveal, rodeado por un halo de hiperpigmentación denominada “ojo de buey”. Si la exposición a la droga continúa, el área afectada puede avanzar hasta la fovea con pérdida de la agudeza visual y en casos más avanzados llegar a afectar a toda la retina con pérdida de visión periférica y visión nocturna.

**Objetivo.** Estudiar la evolución de la actividad funcional de la retina mediante electrorretinograma multifocal (ERGMf) de pacientes a los que se les ha retirado el tratamiento con HCQ por sospecha de toxicidad retiniana.

**Métodos.** En nueve pacientes tratados con HCQ por diversas enfermedades autoinmunes, se compararon los resultados obtenidos en un ERGMf realizado antes (basal) y otro 4-18 meses después (seguimiento) de la retirada del tratamiento con HCQ.

**Resultados.** De las dieciocho retinas estudiadas, en un grupo de doce se observó en el ERGmf de seguimiento un aumento en la densidad eléctrica, mientras que en el resto disminuyó. En ambos grupos los efectos fueron mayores en la región central, anillo 1, del ERGmf. En seis pacientes los resultados del ERGmf de seguimiento confirmaron la existencia de una toxicidad por HCQ. En cambio, en los tres restantes el segundo ERGmf no permitió descartar otras interpretaciones, como la progresión de los efectos en la retina de la enfermedad de base.

**Conclusiones.** En seis pacientes, el ERGmf de seguimiento confirmó la existencia de retinopatía temprana por HCQ y la adecuada retirada del fármaco. En los tres pacientes restantes, el ERGmf de seguimiento no confirmó la existencia de retinopatía, por lo que en ellos sería aconsejable mantener el seguimiento mediante ERGmf de la evolución de sus retinas y reconsiderar, en su caso, la reintroducción de la HCQ. Los resultados obtenidos muestran la utilidad del seguimiento con ERGmf de los pacientes a los que se les ha retirado el tratamiento con HCQ.

## ***Introducción***

La hidroxicloroquina (HCQ), junto con la cloroquina, forma parte de los llamados fármacos antipalúdicos, por su uso inicialmente para el tratamiento de la malaria. Estos fármacos han demostrado, también, ser útiles para el tratamiento de algunas enfermedades del tejido conectivo de naturaleza autoinmune como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjogren y otras [1].

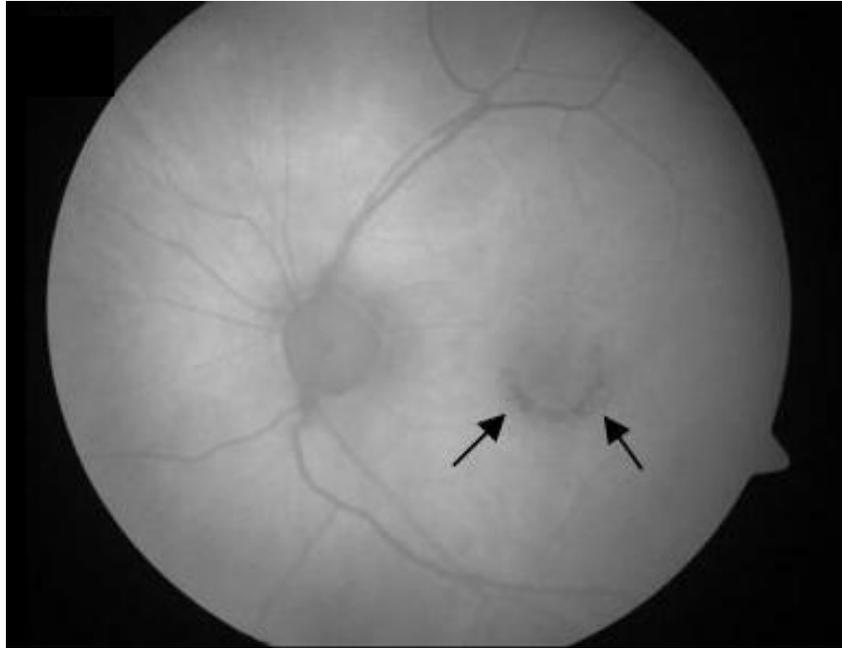
Los antimaláricos son medicamentos bien tolerados y más seguros que otros utilizados en la artritis reumatoide o el lupus, como la D-penicilamina, el metotrexato o la azatioprina. La HCQ ha demostrado tener menos efectos tóxicos que la cloroquina que ha quedado en desuso. Esto se puede atribuir a la adición del grupo hidroxilo que limita la capacidad de la HCQ de atravesar la barrera hematorretiniana [2].

## ***Hidroxicloroquina y toxicidad retiniana***

La HCQ tiene efectos adversos tales como malestar gastrointestinal, erupción cutánea, dolor de cabeza, pero el efecto secundario más importante es su toxicidad retiniana, con posible pérdida permanente de visión [3]. La toxicidad retiniana por HCQ tiene una baja incidencia. Se ha estimado que la toxicidad se da entre un 0,08% a un 0,38% de pacientes que toman dicho fármaco [4, 5].

La toxicidad por HCQ se caracteriza por una maculopatía bilateral con escotomas paracentrales y que, en el examen fundoscópico, presenta un característico anillo de despigmentación del epitelio pigmentario de la retina parafoveal, rodeado por un halo de hiperpigmentación (Fig. 1) denominada “ojo de buey” [6]. En esta fase, los pacientes pueden referir una visión excelente. Si la exposición a la droga continua, el área afectada puede avanzar hasta la fovea con pérdida de la agudeza visual y en casos más avanzados llegar a afectar a toda la retina con pérdida de visión periférica y visión nocturna. Frecuentemente la maculopatía en “ojo de buey” es irreversible, e incluso el deterioro avanza una vez se ha dejado de tomar el fármaco [3]. En casos severos de retinopatía por HCQ es decir, los casos con daño en el epitelio pigmentario de la retina y de “ojo de buey”

visible, hay una progresión constante de la retinopatía durante al menos 3 años después de la retirada del fármaco [7].



**Figura 1.** Retinografía con autofluorescencia de un paciente tratado con HCQ. Las flechas indican la maculopatía en “ojo de buey”

La patogénesis de la retinopatía por HCQ aún no ha sido bien establecida. Se sugiere que el mecanismo de la toxicidad puede ser análogo al de la cloroquina, por su estructura química y de las características de la retinopatía [1]. Estos fármacos se concentran en el epitelio pigmentario retiniano, se unen a la melanina y permanecen allí por periodos de tiempo prolongados [8]. Se ha propuesto que las células del epitelio pigmentario llenas de cloroquina migran y se acumulan en la capa nuclear y plexiforme externa de la retina, produciéndose una alteración del metabolismo del epitelio pigmentario y de su actividad fagocítica de los restos del segmento externo de los fotorreceptores. Esto conlleva finalmente a la degeneración de estos fotorreceptores [9]. En cambio, estudios en animales sostienen que primero hay una alteración en la membrana citoplasmática de las células ganglionares de la retina y de los fotorreceptores, y después es cuando se afecta al epitelio pigmentario de la retina [8]. Además de la acumulación

prolongada en la retina de la HCQ, su eliminación continúa meses después de la suspensión y, aunque en concentraciones muy bajas, puede ser detectable en la sangre un año después [7].

### ***Factores de riesgo***

La toxicidad por HCQ tiene como factores de riesgo la dosis diaria y acumulada, la duración del tratamiento, la existencia de patologías renales, hepática o retiniana y la edad.

De todos los factores de riesgo anteriormente mencionados, la dosis diaria de HCQ es el que más influye en el desarrollo de la retinopatía. Se considera como dosis de riesgo una ingesta diaria mayor de 6.5 mg/kg de peso ideal, ya que dosis superiores se asocian a un incremento significativo de casos de toxicidad por HCQ [3]. Es importante tener en cuenta el peso ideal, libre de grasa o magro, a la hora de calcular la dosis correcta porque solo una pequeña parte del fármaco se acumula en grasa, cerebro y hueso [10]. Esto es especialmente importante en pacientes con baja estatura y con obesidad, ya que es probable que se le prescriban dosis mayores si solo se atienden al peso actual o no se tiene en cuenta la estatura [11]. En cuanto a la dosis acumulada, la mayoría de los casos de toxicidad han ocurrido en pacientes con una dosis acumulada de 1000 g. Por lo que dosis superiores a esta cantidad se considera un factor de riesgo [3]. Sin embargo, existen estudios que muestran que pacientes que recibieron entre 1054 y 3923 g de HCQ no desarrollaron la retinopatía [12]. En relación con la duración del tratamiento, se ha mostrado que en tratamientos inferiores a 5 años es improbable el desarrollo de retinopatía y, por el contrario, que en tratamientos de duración entre 5 y 7 años la incidencia de retinopatía sube al 1% [13]. Por ello se considera como factor de riesgo tratamientos superiores a los 5 años de duración [3].

El riñón y el hígado son los responsables de la excreción del 60% del metabolismo de la HCQ. Las patologías en estos órganos incrementan la retención tisular del fármaco, por lo que aumenta el riesgo de toxicidad. Por otra parte, pacientes con enfermedad retiniana concomitante son considerados como de alto

riesgo. Para muchos autores, la maculopatía es una contraindicación en el tratamiento de HCQ porque enmascara los signos de toxicidad temprana y hace imposible su detección [3]. Los pacientes con más edad son más susceptibles a los efectos tóxicos de la HCQ. Esto es debido al mal funcionamiento del epitelio pigmentario y a una reducción del aclaramiento del fármaco que incrementa su acumulación [14]. En un estudio con 47 sujetos de edades entre 28 y 34 años e historial de tratamiento con HCQ, ninguno de los pacientes menores de 60 años desarrollaron la retinopatía, mientras que 13 pacientes con más de 60 años de edad si la desarrollaron [12]. Finalmente, se ha sugerido que individuos con una mutación en el gen ABCR pueden estar predispuestos a la toxicidad [15].

### ***Detección temprana de la retinopatía por HCQ***

Los daños que se producen en una toxicidad por HCQ establecida son irreversibles, carecen de tratamiento, y pueden continuar empeorando aun cuando se interrumpa el tratamiento. En cambio, el reconocimiento temprano del efecto toxico de la HCQ, antes de que aparezca una alteración visible en el fondo de ojo, minimizará en gran medida su progresión y el riesgo de pérdida visual [7, 16]. Por ello, en pacientes con factores de riesgo, se recomienda llevar a cabo un despistaje o screening para detectar los signos tempranos de daño paracentral retiniano antes del desarrollo de una retinopatía en “ojo de buey”.

Para una detección temprana de la toxicidad por HCQ, la Academia Americana de Oftalmología recomienda la perimetría 10-2; y la realización de al menos dos de las siguientes pruebas objetivas, como la autofluorescencia de fondo de ojo, la tomografía de coherencia óptica de dominio espectral y la electrorretinografía multifocal [3].

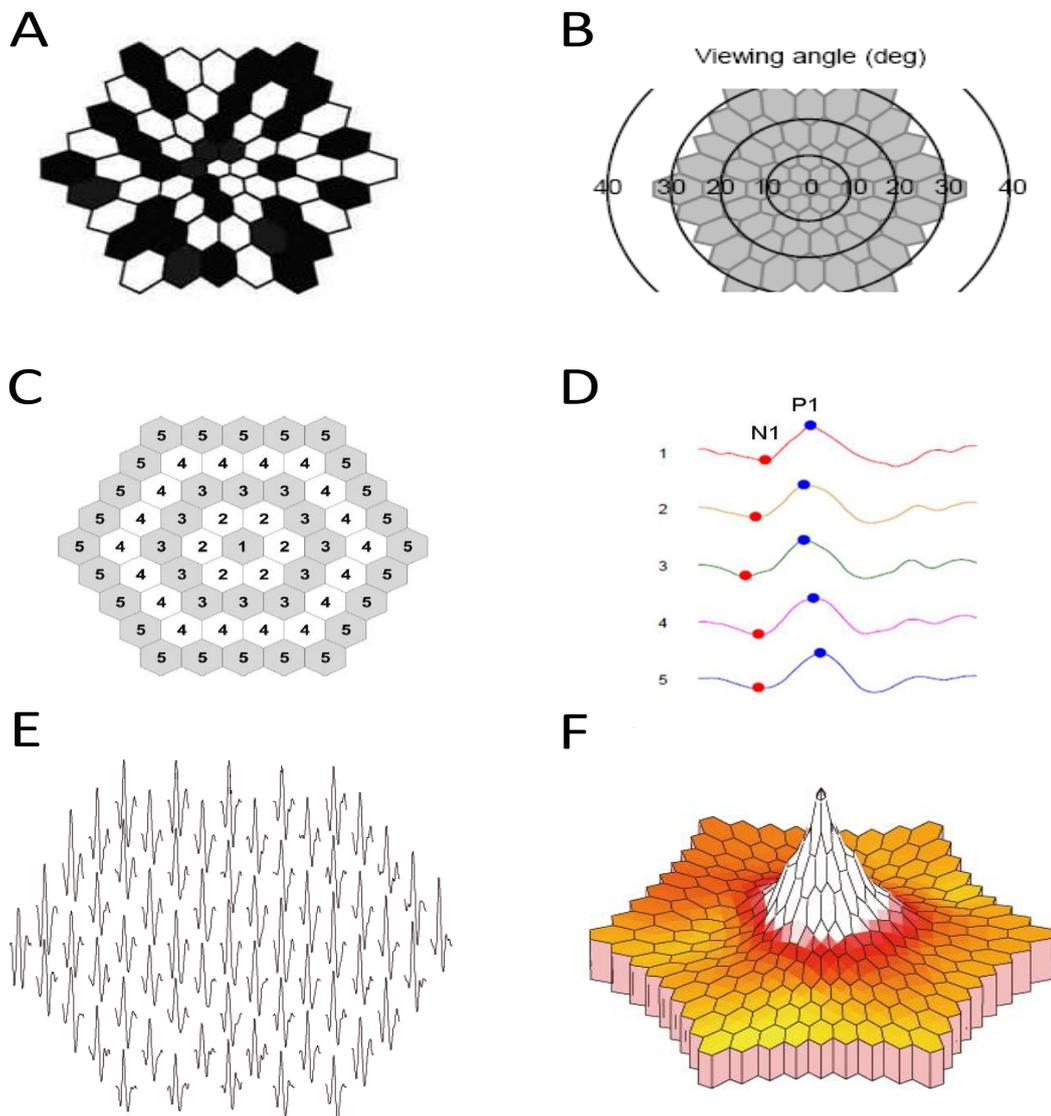
En la perimetría 10-2 de Humphrey, la toxicidad temprana por HCQ se caracteriza por la existencia de escotomas paracentrales aislados, que pueden aumentar y formar una anillo parafoveal completo [3]. Por su parte, la autofluorescencia de fondo de ojo, en el estadio inicial de la toxicidad se caracteriza por un fino anillo paracentral de autofluorescencia aumentada [17, 18].

La tomografía de coherencia óptica de dominio espectral, que permite obtener imágenes de corte de la retina, ofrece datos cuantitativos de la misma, como el grosor de sus capas. En la toxicidad temprana por HCQ, esta técnica muestra la existencia de una ruptura de la línea de conjunción del segmento interno/externo de los fotorreceptores en la región parafoveal [19-21]. Finalmente, la electroretinografía multifocal es la técnica de análisis objetivo del estado funcional de la retina que se propone como la más adecuada para la detección temprana de la toxicidad por HCQ.

### ***Electroretinografía multifocal***

La electroretinografía multifocal desarrollada en 1992 por Sutter y Tran [22] consiste en la estimulación local simultánea de 61 ó 103 áreas diferentes en los 30 grados centrales de la retina con una matriz en forma de damero hexagonal alternante (Fig. 2). El estímulo se presenta en una pantalla de luminancia constante dividida en 61 ó 103 hexágonos, de mayor superficie cuanto más periféricos, que alternan del blanco al negro de forma pseudorrandonizada. Los trazados que se obtienen en el electroretinograma multifocal (ERGmf) no son respuestas directas de cada región de la retina, sino de inferencias matemáticas a través de una función de correlación cruzada entre la señal obtenida y el patrón que aparece en la pantalla. A cada uno de los elementos hexagonales de la matriz el algoritmo les atribuye en el primer orden de correlación (kernel 1) una onda trifásica denominada N1-P1-N2, producida por la respuesta de los fotorreceptores y células bipolares. De esta onda, habitualmente se analizan sus dos primeros componentes, la onda negativa N1 y la positiva P1. Relacionando la intensidad del campo eléctrico, medida por la amplitud en nV de la onda P1, de cada uno de los puntos de estimulación con la superficie de cada hexágono se obtiene la densidad eléctrica del campo para cada área. Los valores se representan habitualmente en una gráfica tridimensional. A diferencia de las técnicas electrofisiológicas precedentes, la electroretinografía multifocal permite la obtención de un mapa topográfico con la actividad eléctrica de cada una de las zonas estimuladas por los distintos hexágonos utilizados [22, 23]. En el análisis de datos, los hexágonos se agrupan de

manera característica en anillos concéntricos que muestran los valores promedio de las ondas N1-P1 que los componen. Con la electroretinografía multifocal puede valorarse la función de todas las capas de la retina y se ha propuesto su uso en el diagnóstico y seguimiento de diversas patologías retinianas como maculopatías, enfermedades de las capas externa e interna retinianas y afecciones de las células ganglionares y de la vía óptica [24].



**Figura 2.** (A) Estímulo utilizado y que consiste en una matriz de 61 hexágonos, que se alternan del blanco al negro de forma aleatoria. (B) Ángulo visual que el estímulo subtiende en la retina. (C) Diagrama de los 61 hexágonos con el número de anillo al que pertenecen. (D) Promedio de las ondas N1 y P1 de cada anillo. (E) ERGmf normal donde se

muestran los 61 trazados y en (F) su correspondiente representación tridimensional de la densidad eléctrica.

La electroretinografía multifocal es especialmente útil para el estudio de la toxicidad por HCQ, ya que permite una evaluación objetiva de la función visual, puede detectar cambios funcionales en la mácula que no se puede encontrar en un test de agudeza visual y puede detectar cambios funcionales tempranos en la retina [25]. Estos cambios funcionales preceden a los estructurales como los observados en la tomografía de coherencia óptica de dominio espectral [26]. En estudios comparativos, la electroretinografía multifocal ha demostrado tener mayor sensibilidad que la perimetría 10-2 o la tomografía de coherencia óptica en la detección de la toxicidad [27].

En la fase inicial de la toxicidad por HCQ, el ERGmf muestra una pérdida de densidad eléctrica en algunas de las celdillas parafoveolares que conforman el anillo 2 del ERGmf [28, 29]. Si la toxicidad avanza, se incrementa el número de celdillas de baja amplitud hasta alterarse la totalidad de ellas. Si no cesa la toma del fármaco, las densidades eléctricas del área central y del área parafoveolar se igualan [30]. En este momento las alteraciones funcionales tienen escasa probabilidad de ser reversibles y las anomalías del ERGmf se extienden bilateralmente al polo posterior de la retina [31]. En un reciente estudio, se sugiere que la retinopatía parafoveolar no es el único signo distintivo de toxicidad temprana por HCQ. En algunos pacientes, sobretodo asiáticos, se ha observado en fase temprana patrones de afectación pericentral de los anillos 4 y 5 o de afectación mixta parafoveolar y pericentral [32].

Por todo lo anterior, la electroretinografía multifocal es la técnica más adecuada para la detección temprana de la toxicidad por HCQ. La información aportada por dicha técnica es clave en la decisión de retirar el tratamiento con HCQ a los pacientes, así como en el seguimiento de los mismos.

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la evolución de la actividad funcional de la retina mediante electroretinografía multifocal de pacientes a los que se les ha retirado el tratamiento con HCQ por sospecha de toxicidad retiniana.

## **Metodología**

Todos los pacientes del estudio han sido atendidos en el Servicio de Neurofisiología Clínica del Hospital Universitario San Cecilio de Granada (HUSC). Se estudiaron sus historias clínicas, prestando especial atención a los datos sobre su enfermedad de base, presencia o no de disfunción renal o hepática, antecedentes de patología retiniana, fecha de inicio y de retirada del tratamiento con HCQ, dosis diaria de HCQ, síntomas visuales y causa de la retirada del fármaco.

La evaluación de la retina mediante electroretinografía multifocal (Diagnosys LLC, Lowell MA, USA) fue realizada en el Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva del Instituto de Neurociencias de la Universidad de Granada, siguiendo las recomendaciones de la International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Cada electroretinografía multifocal consistió en la obtención de 61 registros, que para su análisis se agruparon en 5 anillos concéntricos (Figura 2).

De cada paciente, se han analizado los datos obtenidos en los dos ERGmf realizados. Uno en el momento de la retirada del tratamiento con HCQ, que denominaremos ERGmf basal, y el realizado tras la retirada del tratamiento con HCQ y que denominaremos ERGmf de seguimiento. De los ERGmf estudiados se analizaron los valores de latencia N1 y P1 y la densidad P1 de los cinco anillos que la componen y se compararon los resultados obtenidos en ambos registros.

Para el análisis estadístico de datos se utilizó el test Shapiro-Wilk como test de normalidad para las muestras, la prueba T-Student para muestras paramétricos y la de Mann-Whitney para las no paramétricas. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago).

## **Resultados**

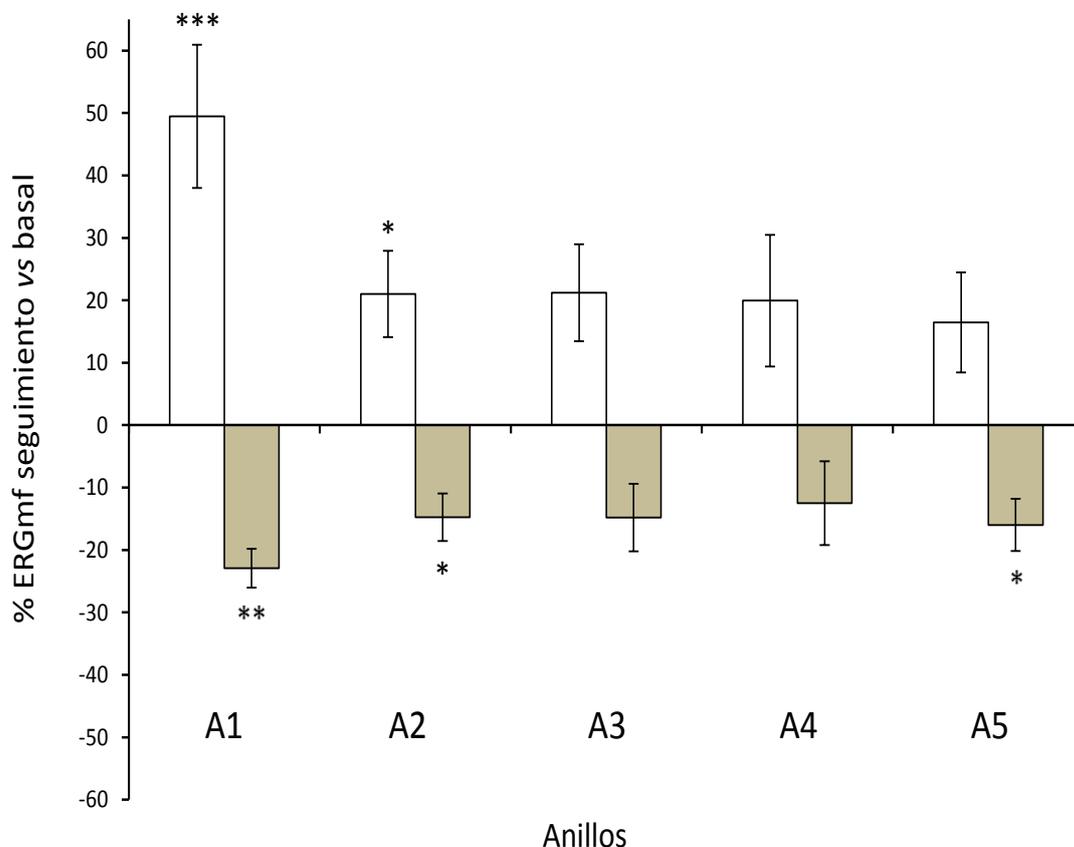
Todos los pacientes son mujeres, con una edad media ( $\pm$  desviación típica) de  $45,89 \pm 13,83$  años. La indicación del tratamiento con HCQ incluyen el lupus eritematoso sistémico ( $n = 2$ ), conectivopatía indiferenciada ( $n = 3$ ), artritis reumatoide ( $n = 1$ ), lupus eritematoso discoide ( $n = 1$ ) y síndrome de Sjögren ( $n = 2$ ). En tres casos se diagnosticó un síndrome de Sjögren secundario. En el conjunto

de los pacientes, el tiempo de tratamiento con HCQ es de  $4,26 \pm 3,37$  años de media y la dosis diaria y acumulada de dicho fármaco es de  $270,58 \pm 80,58$  mg y  $438,31 \pm 479,83$  g de media, respectivamente. Tres de los pacientes referían pérdida de visión en el tiempo en el que se realizó el ERGmf basal.

En la paciente 1 la HCQ fue retirada tras la detección por su oftalmólogo de una maculopatía en “ojo de buey”, y que se muestra en la figura 1, y por los hallazgos del ERGmf basal. En las 8 pacientes restantes, el tratamiento con HCQ se retiró tras las alteraciones observadas en el ERGmf basal realizado, y que variaron de disminuciones de la densidad de P1 localizadas en áreas paramaculares y centrales a disminuciones generalizadas en toda la retina. El tiempo medio entre el ERGmf basal y el de seguimiento fue de  $10,09 \pm 4,99$  meses, con un rango entre 4 y 18 meses.

Teniendo en cuenta la densidad del anillo 1, se establecieron dos grupos experimentales: un grupo formado por 12 retinas en las que hubo un aumento de densidad del anillo 1 en el ERGmf de seguimiento, comparado con el ERGmf basal y un segundo grupo, formado por 6 retinas en las que se observó una disminución de dicha densidad. En adelante, estos dos grupos se denominarán grupo de aumento y de disminución de densidad P1, respectivamente.

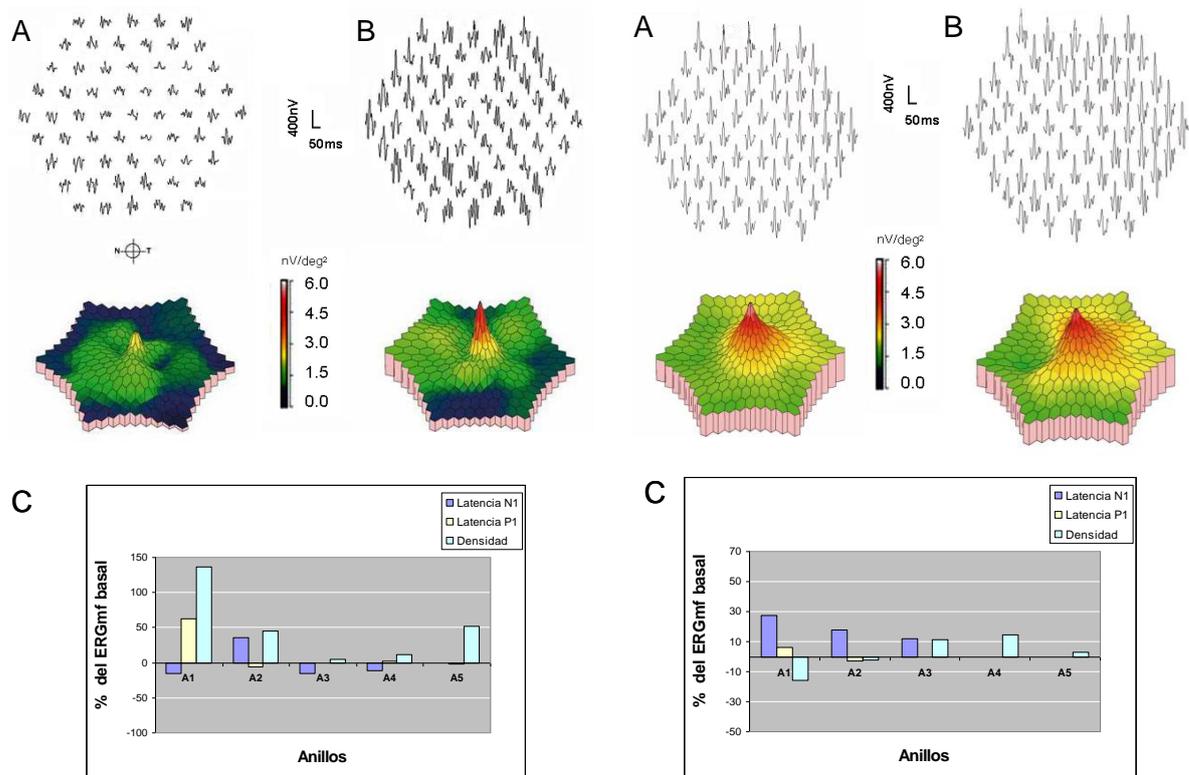
Como se muestra en la figura 3, en el grupo de aumento de densidad, en el ERGmf de seguimiento se observaron aumentos de la densidad P1 en todos los anillos. Este aumento fue significativo en los anillos 1 ( $P = 0,0002$ ) y 2 ( $P = 0,03$ ). En el grupo de disminución, se observaron descensos de densidad en todos los anillos, siendo significativos en los anillos 1 ( $P = 0,006$ ), 2 ( $P = 0,026$ ) y 5 ( $P = 0,018$ ). En cuanto a las latencias N1 y P1 no se encontraron diferencias significativas entre el ERGmf basal y de seguimiento en ninguno de los anillos de ambos grupos experimentales



**Figura 3.** Porcentajes de cambio en la densidad P1 tras la retirada del tratamiento con HCQ. Barras claras grupo de aumento de amplitud de P1. Barra oscuras, grupo de disminución de amplitud. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

En la figura 4 se muestran, a modo de ejemplo, los ERGmf basal y de seguimiento de una paciente que pertenece al grupo de aumento y los de una del grupo de disminución, respectivamente.

La edad media de ambos grupos experimentales fue similar,  $47,42 \pm 15,25$  años para el grupo de aumento y  $44,50 \pm 10,07$  años para el de descenso. Aun cuando sin llegar a la significación estadística, el grupo de aumento mostró, frente al de descenso, menor número de años de tratamiento ( $3,17 \pm 2,46$  vs  $6,44 \pm 3,81$  años) y menor dosis diaria ( $242,26 \pm 52,32$  vs  $327,24 \pm 97,77$  mg) y acumulada ( $266,37 \pm 198,86$  vs  $794,60 \pm 586,07$  g) de HCQ ( $P = 0,9$ ).



## Discusión

Todas las pacientes incluidas en el presente trabajo han sido derivadas a nuestro laboratorio por sus especialistas bajo la sospecha de toxicidad retiniana por HCQ, a excepción de un caso de toxicidad cierta detectada por su oftalmólogo al observar,

en una exploración fundoscópica de control, la presencia de maculopatía en “ojo de buey” y que corresponde a la paciente 1 de nuestro estudio.

En el primer ERGmf realizado, o basal, todas las pacientes mostraron disminución en la densidad eléctrica de la onda P1 en ambas retinas. La disminución de densidad eléctrica en las respuestas varió, entre los casos, desde una afectación preferente en los anillos centrales 1 y 2, que corresponden a la región macular de la retina, a una disminución de densidad en todos los anillos del registro. Estas alteraciones del ERGmf sustentan las sospechas de sus médicos de la presencia de una toxicidad por HCQ [29-31], por lo que se acordó con ellos el cese del tratamiento con HCQ.

La decisión de interrumpir el tratamiento con HCQ es muy trascendente, porque supone que al paciente hay que administrarle una medicación alternativa que a veces conlleva un peor control de su enfermedad y efectos secundarios indeseables [27]. No obstante, los datos del ERGmf basal obtenidos en todas las pacientes apoyan la retirada de la HCQ. En beneficio del paciente y para confirmar y mantener la decisión tomada, pasados unos meses, se realizó un segundo ERGmf, o de seguimiento, con el objeto de ver la evolución de las retinas tras la retirada de la HCQ. Los meses transcurridos entre el ERGmf basal y el de seguimiento variaron entre 4 y 18 meses, según los pacientes, en función de su disponibilidad y del interés nuestro por evaluar en diferentes tiempos los efectos de dicha medida.

De los cinco anillos que componen el ERGmf, el anillo 1 o foveal es el que menos se afecta por problemas de refracción [33]. Esto, junto con su trascendencia funcional al ser responsable de la agudeza visual, determinó que los dos grupos experimentales en los que se dividieron las retinas estudiadas se organizaran en función de los resultados obtenidos en la densidad eléctrica de la onda P1 en este anillo.

Tras la retirada del tratamiento con HCQ, de las 18 retinas estudiadas, 12 mostraron en el ERGmf de seguimiento un aumento en la densidad del anillo 1. En la mayoría de las mismas, el incremento de densidad también se observó en el resto de los anillos. Por ello, analizados en conjunto, el grupo de aumento presenta incrementos en los cinco anillos, siendo significativo en los anillos centrales 1 y 2.

Estos resultados concuerdan con estudios previos que muestran que en casos de toxicidad temprana la pérdida de la repuesta de densidad puede ser reversible [33-35]. En la mejora de la respuesta retiniana observada en este grupo puede influir el hecho de que ninguno de las pacientes que lo componen superó las dosis diaria ni acumulada de riesgo, que son dos de los factores más determinantes en la toxicidad [36], y sólo en dos casos se superaron los cinco años de tratamiento. En la paciente 9, la recuperación de la respuesta retiniana fue observada a los cuatro meses tras la retirada de la HCQ, un tiempo significativamente menor que los dos años requeridos para constatar mejoras estructurales tras el cese del tratamiento [7]. Esto indica que la recuperación de las alteraciones funcionales y estructurales producidas por la HCQ siguen patrones temporales diferentes.

En las restantes 6 retinas, el ERGmf de seguimiento mostró respecto del basal una disminución de densidad en el anillo 1 y, en la mayoría de los casos, en el resto de los anillos. Esto puede deberse bien a un efecto tóxico de la HCQ que, debido a su acumulación en el epitelio pigmentario de la retina, puede continuar tras su retirada [31, 37], o a la enfermedad de base del paciente. En nuestro caso, cuatro de las retinas que disminuyeron su respuesta pertenecen a las pacientes 6 y 7. En la paciente 6, con signos claros de afectación predominante macular en el ERGmf basal (Fig. 4), la evolución negativa tras la retirada de la HCQ es más probable que se deba a la progresión del efecto tóxico por su permanencia en el epitelio pigmentario de la retina [31]. En cambio, en la paciente 7, que en el ERGmf basal mostró como alteración predominante una disminución leve de densidad en los 5 anillos de ambos ojos, puede que su evolución negativa tras la retirada de la HCQ se deba más al avance de su enfermedad de base, al estar ahora peor tratada.

En las pacientes 2 y 5, la retirada de la HCQ produjo efectos diferentes en ambos ojos observándose un aumento de densidad en un ojo y una disminución en el otro. Los efectos tóxicos de la HCQ se caracterizan por ser bilaterales [1, 3] por lo que la interpretación de los resultados en estas dos pacientes es más difícil y apunta bien a una toxicidad temprana que no ha culminado en ambos ojos, o a un efecto secundario farmacológico de la HCQ, que no puede considerarse propiamente como toxicidad, pero que altera los valores del ERGmf como han mostrado estudios previos [38]. La primera interpretación parece más adecuada

en el caso de la paciente 2, ya que el ERGmf basal mostraba cambios concordantes con toxicidad por HCQ, como una pérdida de densidad importante en el anillo 1 de ambos ojos. En cambio en la paciente 5, las alteraciones del ERGmf basal eran más difusas y con mayor afectación en ojo el derecho, por lo que los cambios duales observados tras la retirada de la HCQ pueden deberse a su efecto farmacológico y no tóxico sobre la retina.

En estas cuatro pacientes (2, 5, 6 y 7) sería conveniente realizar un segundo ERGmf de seguimiento para observar a más largo plazo la evolución de dichas retinas. Con ello, se podría reconsiderar la reintroducción o no del tratamiento con HCQ en dosis más bajas, especialmente en las pacientes 5 y 7 donde el ERGmf de seguimiento realizado ha introducido dudas sobre la existencia de toxicidad temprana en las mismas. Por otra parte, en estos casos difíciles, la ayuda de técnicas complementarias como la tomografía de coherencia óptica es aconsejable [39].

Como se ilustra en la figura 3, el porcentaje de incremento de la densidad en el anillo 1 en el grupo de aumento duplica al de descenso de dicho anillo en el grupo de disminución. Esto puede deberse a que los pacientes que mejoran los valores de densidad del ERGmf tras la retirada de la HCQ, se encuentran en una fase temprana de afectación del anillo 1 o foveal. De manera que el efecto tóxico de la HCQ sobre este anillo es revertido más fácilmente. En este sentido, es ilustrativo el caso de la paciente 1, con degeneración irreversible en “ojo de buey” paramacular, lo que correspondería al anillo 2 del ERGmf. Tras 12 meses de retirada de la HCQ se observó una mejora en los valores de densidad del anillo 1 superior al 50% en los dos ojos, mientras que los valores del anillo 2 permanecieron sin cambio.

Aun cuando no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de aumento y disminución de la densidad en cuanto la duración del tratamiento con HCQ o las dosis diarias y acumuladas de la misma, y de acuerdo con evidencias previas [3] el grupo de disminución, o que empeoran, lo integran pacientes con más años de tratamiento y con mayores dosis diarias y acumuladas de HCQ.

A diferencia de los resultados obtenidos con la densidad eléctrica de las respuestas del ERGmf, los cambios observados en las latencias N1 y P1 no fueron

significativos en ningún anillo de los dos grupos experimentales. Esto, está de acuerdo con datos previos [38], e indica que la HCQ afecta más a la densidad eléctrica de las respuestas del ERGmf que a los tiempos de culminación de las ondas N1 y P1 que lo componen.

En resumen, de las nueve pacientes estudiadas, ocho muestran alteraciones en el ERGmf basal que sugieren en mayor o menor medida la existencia de una toxicidad retiniana por HCQ en fase temprana y la restante presenta toxicidad cierta en “ojo de buey”. En cinco de ellas la retirada de la HCQ mejoró la actividad electrofisiológica de ambas retinas, lo que confirmaría la sospecha previa de toxicidad por HCQ, y en dos de ellas las empeoró. De estas dos, la evolución negativa en una sugiere la existencia de un efecto tóxico prolongado por acumulación retiniana del fármaco. En cambio en la otra paciente, y en base a las características del ERGmf basal, no se puede descartar que su evolución negativa tras la retirada de la HCQ sea debida a un empeoramiento de su enfermedad de base. Finalmente, en las dos pacientes restantes, el cese del tratamiento con HCQ produjo efectos opuestos en las dos retinas, lo que puede indicar que los hallazgos del ERGmf basal se deban más a un efecto farmacológico que tóxico de la HCQ.

### ***Conclusiones***

Los resultados obtenidos muestran: (i) en seis pacientes, el ERGmf de seguimiento confirmó la existencia de retinopatía temprana por HCQ y la adecuada retirada del fármaco. (ii) En los tres pacientes restantes, el ERGmf de seguimiento no confirmó la existencia de retinopatía, por lo que en ellos sería aconsejable mantener el seguimiento mediante ERGmf de la evolución de sus retinas y reconsiderar, en su caso, la reintroducción de la HCQ. (iii) Los resultados obtenidos muestran la utilidad del seguimiento con ERGmf de los pacientes a los que se les ha retirado el tratamiento con HCQ.

## ***Bibliografía***

1. Yam JCS, Kwok AKH. (2006). Ocular toxicity of hydroxychloroquine. *Hong Kong Med J.* 12:294-304.
2. Raines MF, Bhargava SK, Rosen ES. (1989). The blood-retinal barrier in chloroquine retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 30:1726-1731.
3. Marmor MF, Kellner U, Lai TY, Melles RB, Mieler WF. (2016). American Academy of Ophthalmology Recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy. *Ophthalmology.* 123:1386-1394.
4. Levy GD, Munz SJ, Paschal J, Cohen HB, Pince KJ, Peterson T. (1997). Incidence of hydroxychloroquine retinopathy in 1,207 patients in a large multicenter outpatient practice. *Arthritis Rheum.* 40:1482-1486.
5. Mavrikakis I, Sfikakis PP, Mavrikakis E, et al. (2003). The incidence of irreversible retinal toxicity in patients treated with hydroxychloroquine: a reappraisal. *Ophthalmology.* 2003; 110:1321-1326.
6. Elder M, Rahman AMA, McLay J. (2006). Early paracentral visual field loss in patients taking hydroxychloroquine. *Arch Ophthalmol.* 124:1729-1733.
7. Marmor MF, Hu J. (2014). Effect of Disease Stage on Progression of Hydroxychloroquine Retinopathy. *JAMA Ophthalmol.* 132:1105-1112.

8. Rosenthal RA, Kolb H, Bergsma D, Huxsoll D, Hopkins JL. (1978). Chloroquine retinopathy in the rhesus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 17:1158-1175.
9. Bernstein HN, Ginsberg J. (1964). The pathology of chloroquine retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 71:238-245.
10. Mackenzie AH. (1983). Dose refinements in long-term therapy of rheumatoid arthritis with antimalarials. *Am J Med.* 75:40-45.
11. Easterbrook M. (2002). Screening for antimalarial toxicity: current concepts. *Can J Ophthalmol.* 37:325-328.
12. Johnson MW, Vine AK. (1987). Hydroxychloroquine therapy in massive total doses without retinal toxicity. *Am J Ophthalmol.* 104:139-144.
13. Wolfe F, Marmor MF. (2010). Rates and predictors of hydroxychloroquine retinal toxicity in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res.* 62:775-784.
14. Falcone PM, Paolini L, Lou PL. (1993). Hydroxychloroquine toxicity despite normal dose therapy. *Ann Ophthalmol.* 25:385-388.
15. Shroyer NF, Lewis RA, Lupski JR. (2001). Analysis of the ABCR (ABCA4) gene in 4-aminoquinoline retinopathy: is retinal toxicity by chloroquine and hydroxychloroquine related to Stargardt disease? *Am J Ophthalmol.* 131:761-766.

16. Sáez Moreno JA, Dominguez Hidalgo C, Rodríguez-Ferrer JM. (2015). Multifocal ERG Guiding Therapy in a Case of Hydroxychloroquine Premacularopathy. *Case Reports in Ophthalmological Medicine* 2015. DOI:10.1155/2015/656928.
17. Kellner U, Renner AB, Tillack H. (2006). Fundus autofluorescence and mfERG for early detection of retinal alterations in patients using chloroquine/hydroxychloroquine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:3531-3538.
18. Kelmenson AT, Brar VS, Murthy RK, Chalam KV. (2009). Fundus autofluorescence and spectral domain optical coherence tomography in early detection of Plaquenil maculopathy. *Eur J Ophthalmol.* 20:785-788.
19. Chen E, Brown DM, Benz MS, et al. (2010). Spectral domain optical coherence tomography as an effective screening test for hydroxychloroquine retinopathy (the “flying saucer” sign). *Clin Ophthalmol.* 4:1151-1158.
20. Stepien KE, Han DP, Schell J, Godara P, Rha J, Carroll J. (2009). Spectral domain optical coherence tomography and adaptive optics may detect hydroxychloroquine retinal toxicity before symptomatic vision loss. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 107:28-33.
21. Rodríguez-Padilla JA, Hedges TR, Monson B, et al. (2007). High-speed ultra-high-resolution optical coherence tomography findings in hydroxychloroquine retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 125:775-780.
22. Sutter EE, Tran D. (1992). The field topography of ERG components in man-I. The photopic luminance response. *Vis Res.* 32:433-446.

23. Sutter EE. (2001). Imaging visual function with the multifocal m-sequence technique. *Vision Res.* 41:1241-1255.
24. Hood DC, Odel JG, Chen CS, Winn BJ. (2003). The multifocal electroretinogram. *J Neuro-ophthalmol.* 23:225-235.
25. Tsang AC, Ahmadi Pirshahid S, Virgili G, Gottlieb CC, Hamilton J, Coupland SG. (2005). Hydroxychloro-quine and chloroquine retinopathy: a systematic review evaluating the multifocal electroretinogram as a screening test. *Ophthalmology.* 122:1239-1251.
26. Greenstein VC, Amaro-Quireza L, Abraham ES, Ramachandran R, Tsang SH, Hood DC. (2015). A comparison of structural and functional changes in patients screened for hydroxychloroquine retinopathy. *Doc Ophthalmol.* 130:13-23.
27. Browning DJ, Lee C. (2014). Relative sensitivity and specificity of 10-2 visual fields, multifocal electroretinography, and spectral domain optical coherence tomography in detecting hydroxychloroquine and chloroquine retinopathy. *Clin Ophthalmol.* 8:1389-1399.
28. Debellemanniè G, Flores M, Tumahai P, et al. (2015). Assessment of parafoveal cone density in patients taking hydroxychloroquine in the absence of clinically documented retinal toxicity. *Acta Ophthal.* doi:10.1111/aos.12728.
29. Marmor MF. (2012). Comparison of screening procedures in hydroxychloroquine toxicity. *Arch Ophthalmol.* 130:461-469.

30. Raster M, Horn F, Junemann A, et al. (2011). Retinal disorders in northern Brazilian patients treated with chloroquine assessed by multifocal ERG. *Doc Ophthalmol.* 122:77-86.
31. Michaelides M, Stover NB, Francis PJ, Weleber RG. (2011). Retinal toxicity associated with hydroxychloroquine and chloroquine: risk factors, screening, and progression despite cessation of therapy. *Arch Ophthalmol.* 129:30-39.
32. Melles RB, Marmor MF. (2015). Pericentral Retinopathy and Racial Differences in Hydroxychloroquine Toxicity. *Ophthalmology.* 122:110-116.
33. Lyons JS, Severns ML. (2009). Using multifocal ERG ring ratios to detect and follow plaquenil toxicity: a review. *Doc Ophthalmol.* 118:29-36.
34. Maturi RJ, Yu M, Weleber RG. (2004). Multifocal Electroretinographic Evaluation of Long-term Hydroxychloroquine Users. *Arch Ophthalmol.* 122:973-981.
35. Moschos MN, Moschos MM, Apostolopoulos M, Mallias JA, Bouros Ch, Theodossiadis GP. (2004). Assessing hydroxychloroquine toxicity by the multifocal ERG. *Documenta Ophthalmologica.* 108:47-53.
36. Rodríguez-Ferrer JM, Sáez-Moreno JA, Rodríguez-Hurtado FJ. (2014). Retinopatía por hidroxiclороquina: nuevas evidencias y recomendaciones. *Actual Med.* 99:86-92.

37. Ferreras A, Pinilla I, Abecia E, Pajarín AB, Honrubia FM. (2007). Retinal toxicity following chloroquine therapy. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 82:103-108.
  
38. Lai TY, Chan WM, Li H, Lai RY, Lam DS. (2005). Multifocal electroretinographic changes in patients receiving hydroxychloroquine therapy. *Am J Ophthalmol.* 140:794-807.
  
39. Cukras C, Huynh N, Vitale S, Wong WT, Ferris FL, Sieving PA. (2015). Subjective and Objective Screening Tests for Hydroxychloroquine Toxicity. *Ophthalmology.* 122:356-366.



## CAPÍTULO 6

### Neuronas espejo

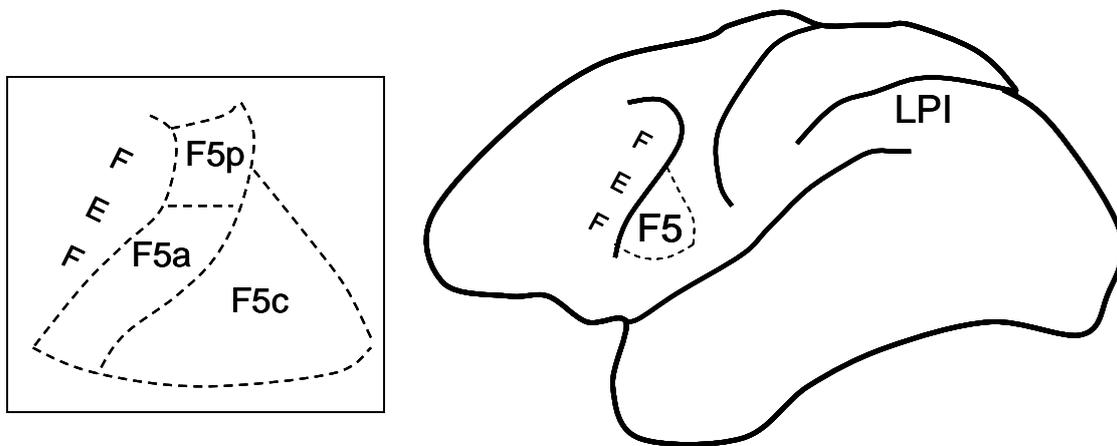
Figuroa-Arenas D, Rodríguez-Ferrer JM

#### Resumen

Las neuronas espejo fueron descritas por Rizzolatti en los años 90 en la corteza premotora del cerebro del mono. Estas neuronas tienen como principal característica el que se activan cuando el primate realiza una acción y también cuando observa la realización de dicha acción por un congénere. De ahí, el nombre de neuronas espejo. Mediante técnicas de neuroimagen se ha comprobado la existencia de estas neuronas también en el cerebro humano. Las neuronas espejo han supuesto un gran descubrimiento en el campo de la neurociencia ya que están implicadas en diversos procesos mentales como la comprensión motora, el habla, la imitación y las emociones. Las neuronas espejo intervienen también en los procesos de neuro-rehabilitación, y sus alteraciones parecen ser uno de los principales factores que intervienen en el desarrollo del autismo.

## Introducción

Las neuronas espejo fueron descubiertas por Rizzolatti y colaboradores a mediados de los años 90 del siglo pasado en el lóbulo frontal, en la parte ventral de la corteza premotora del primate, denominada como zona o área F5 (Fig. 1). Esta zona cortical, situada detrás de los campos frontales oculares, está implicada en funciones visomotoras. La gran mayoría de las neuronas espejo se sitúan en la región F5c [1, 2].



**Figura 1.** Imagen del cerebro del mono rhesus en la que se muestra la localización del área F5 situada en el lóbulo frontal en donde se encontraron por primera vez las neuronas espejo. Estas neuronas junto con las encontradas en el lóbulo parietal inferior (LPI) forman el sistema tronto-parietal de neuronas espejo del primate. A la izquierda se muestra una imagen aumentada con las regiones del área F5. Las neuronas espejo se encuentran en su mayoría en la región F5c. La región F5p contiene a las “canonical neurons”. FEF: campos frontales oculares. Modificado de Rizzolatti y cols [2].

Las neuronas espejo tienen ese nombre porque se activan cuando el mono realiza una acción y también cuando observa la realización por parte de otra persona de una actividad igual a la que él había realizado [3, 4]. En el área F5 se encontraron también otras neuronas que respondían a la presentación 3D de un objeto, pero no necesitaban una acción para ser activadas. Estas neuronas se denominaron *canonical neurons* y están situadas en la región F5p [5].

En base a las diferencias funcionales observadas entre las neuronas espejo, éstas se han clasificado en dos tipos: neuronas espejo estrictas y neuronas espejo amplias [4]. Las neuronas espejo estrictas se activan cuando tanto el observador como el sujeto que ejecuta la acción realizan el mismo acto motor, con el mismo objetivo y de la misma forma para llegar al objetivo. Esta clase de neuronas representan 1/3 de las neuronas espejo que podemos encontrar en la zona F5. En cambio, las neuronas espejo amplias sólo necesitan similitud entre el acto motor observado y el realizado y representan 2/3 de las neuronas espejo de la zona F5 [4]. Por otra parte, diversos estudios han demostrado la existencia de otro sistema de neuronas espejo situado en la zona inferior del lóbulo parietal, dentro y por debajo del surco intraparietal [6].

Las neuronas espejo funcionan mediante mecanismos de imitación complejos que requieren altas capacidades cognitivas. Hasta el momento, sólo se ha demostrado su presencia en monos, simios y humanos y en el cerebro de algunos pájaros [7].

### ***Neuronas espejo en el ser humano***

Las primeras evidencias acerca de la existencia en humanos de neuronas parecidas a las neuronas espejo de los primates se pueden encontrar ya en estudios de los años 50 [8, 9]. En estos estudios se observó una desincronización del ritmo *mu*, la cual no solamente ocurría cuando el sujeto realizaba la acción objeto de estudio, sino que también ocurría cuando observaba la realización de la misma.

Más recientemente y mediante técnicas de neuroimagen y estimulación magnética transcraneal se han obtenido un gran número de evidencias que avalan la presencia de un sistema de neuronas espejo en el ser humano y que demuestran la activación de la corteza prefrontal motora y de zonas parietales inferiores tanto durante la observación como con la ejecución de actos motores. Sin embargo, el estudio de Mukamel y colaboradores [10], publicado en 2010, ha sido el primero en obtener evidencia directa de la existencia de las neuronas espejo en el ser humano.

Se han localizado diferentes zonas de neuronas espejo en el cerebro humano, situadas en la parte ventral del córtex premotor y parte caudal del giro

frontal y parte inferior del lóbulo parietal, e involucradas en el reconocimiento de las acciones [11]. También se ha descrito un sistema de neuronas espejo denominado límbico, situado en la región de la ínsula y en circunvolución cingulada anterior, responsable de las emociones y del comportamiento afectivo [11, 12].

### ***Neuronas espejo y comprensión motora***

Actualmente, se sugiere que los circuitos visomotores frontoparietales están relacionados con el entendimiento de los objetivos de un acto motor llevado a cabo por una persona en un momento. En estos circuitos, las neuronas espejo son fundamentales a la hora de la comprensión de una acción motora llevada a cabo por un congénere o por el experimentador, aun cuando no son los únicos mecanismos implicados en ello [13].

Este papel de comprensión motora de las neuronas espejo se ha revelado utilizando dos estrategias experimentales. En la primera, el primate está en una condición de observación completa. Es decir, ve por completo todas las acciones que realiza el investigador. En la segunda, el mono sólo ve la mano del experimentador a través de una pantalla y se pierde la parte final del movimiento, la cual es la relacionada con el acto motor [14].

En estos estudios se observó que aproximadamente la mitad de las neuronas espejo en el mono se veían activadas en la segunda condición. Y más importante aún, si el primate tiene suficientes pistas de la actividad que se está llevando a cabo, sus neuronas espejo van a formar una representación de ésta, incluso sin ver toda la acción. [14]. Esto también se puede observar en la organización de los actos motores en monos, en cadena, es decir paso a paso. Sucede que gracias a las neuronas espejo, el primate es capaz de comprender y completar la acción sin la necesidad de ver todos los pasos de los que consta esta cadena [15]. Lo cual demuestra la teoría de que estas neuronas se encargan de la comprensión de una acción. En el primate, el sistema de neuronas espejo se ha mostrado para acciones que presentan relación con la observación y ejecución de actos motores relacionados con la mano y la boca [3, 4, 16].

Diversos estudios han dado pruebas fehacientes de que el sistema fronto-parietal del ser humano codifica las acciones motoras. Así, en el estudio de Gazzola y colaboradores [17] en el cual se instaba a los participantes a observar una serie de imágenes tanto de un brazo robótico, como de un brazo humano agarrando un objeto, se observó la activación de este sistema en ambas condiciones. En otros estudios, el experimento fue llevado a cabo con personas que carecían tanto de brazos como de piernas [15, 18, 19]. En comparación con sujetos normales, se observó que en pacientes que nunca habían realizado actos motores con las manos, se les activaba las áreas fronto-parietales de neuronas espejo gracias a la observación de estas tareas las cuales nunca habían realizado.

De igual modo que en el mono, las neuronas espejo actúan a la hora de la comprensión de una acción llevada a cabo por otra persona y de la intención de la misma [20]. Lo cual nos indica que las neuronas espejo son fundamentales para comprender acciones realizadas por otras personas relacionadas con actividades cotidianas. Diversos estudios han mostrado que a mayor grado de entrenamiento en la realización de un acto motor, más fuerte es la activación en las neuronas espejo al observar a otro realizando dicha actividad [15, 21-23].

En el ser humano, los comportamientos relacionados con la imitación se encuentran presentes en los primeros días de vida. No obstante, estos comportamientos iniciales no están relacionadas con las neuronas espejo ya que su actividad aparece a partir de los 6 meses [24].

En resumen, el descubrimiento de los diversos sistemas de neuronas espejo en humanos han mostrado que las funciones de imitación, observación y predicción son atribuibles a las mismas. Esto provoca una ruptura parcial con la concepción clásica de que estas funciones eran solo atribuibles a procesos mentales superiores generales no específicos [25].

### ***Neuronas espejo en el habla***

El lenguaje humano que en su inicio sólo se realizaban onomatopeyas evolucionó hasta el lenguaje actual donde los significados se relacionan mediante estructuras complejas con ítems léxicos y palabras organizados en sistemas sintácticos. La comunicación por el lenguaje requiere algo más que la simple emisión de sonidos [26, 27].

El lenguaje es un proceso cerebral gradual y consta de una serie de procesos que implican la capacidad de comprender determinados movimientos familiares implicados en el mismo. En segundo lugar el reconocimiento de acciones complejas y en tercer lugar la existencia de diversos mecanismos complejos de imitación [28].

En el ser humano el sistema de neuronas espejo también se ha encontrado en el área de Broca, que incluye al área 44 de Brodmann, [29, 30] y que es la principal área cortical del habla. En experimentos en los que se le pidió a los sujetos que escucharan atentamente una serie de palabras, unas conllevaban un movimiento de lengua y otras no, se observó un aumento de actividad de los potenciales motores evocados en las palabras que incluían movimientos de la lengua. Lo cual nos indica la presencia de un sistema espejo encargado de transformar los fonemas que oímos en su correspondiente engrama motor, responsable del mismo sonido [31].

En monos, parece que se activa este mismo sistema pero cuando se oye romperse un cacahuete. Este sonido lleva también consigo un acto motor y de la comprensión de este acto motor se encargan las neuronas espejo.

En el lenguaje, la gran mayoría las palabras o de las acciones relacionadas con el fonema están desvinculadas [1, 15]. Lo cual sugiere que el siguiente paso lógico en la evolución del lenguaje es la transformación del significado de un gesto a su relación con el significado del sonido que se emite. Por lo cual, tanto mano como brazo han de estar conectados a nivel neural con los diferentes gestos que se realizan a la hora del habla. Esto se ha probado en un gran número de estudios realizados con estimulación magnética transcraneal, se muestra un aumento de actividad en la corteza motora relacionada con la mano, cuando se lee y se habla. [15]. Este efecto se encuentra limitado al hemisferio izquierdo.

Diversos estudios apoyan la teoría de un sustrato neural común entre mano y habla. Gentilucci y colaboradores [32], pidieron a voluntarios que pronunciaran una sílaba, (por ejemplo, Gu o Ga), en lugar de una simple apertura de boca. Encontraron que la apertura de la boca a la hora de pronunciar estas sílabas era mayor cuando las personas sujetaban un objeto. Al mismo tiempo se analizó, el registro vocal y se comprobó que el pico de decibelios se producía cuando se sujetaba el objeto.

La influencia de sujetar objetos no solamente afecta al ejecutor, también afecta al observador del acto. Gentilucci [33] pidió a voluntarios la vocalización de una serie de silabas (por ejemplo, Ba o Ga) mientras observaban a otro individuo coger objetos de diversos tamaños. Se observó un aumento en el tono y en la apertura labial del observador cuando el individuo se disponía a agarrar el objeto. Con estos datos se puede observar como los movimientos bucales y manuales están conectados, incluyendo también movimientos orolaríngeos necesarios para la producción del habla [34].

### ***Neuronas espejo e imitación***

Dentro de la gama de movimientos motores que presenta el ser humano están los movimientos transitivos. Que son aquellos que van dirigidos a un objetivo específico, como alargar el brazo para agarrar una taza. El entendimiento de estos actos los lleva a cabo las neuronas espejo que nos dan además claves para comprender el mecanismo básico de la imitación [1].

El término imitación, ha sido definido de múltiples formas, sin embargo dos de ellas pueden ser consideradas como las más comunes: (i) la imitación es la capacidad que presenta un individuo de imitar un acto motor llevado a cabo por otra persona mediante la observación [35]. (ii) La imitación es la capacidad de adquisición de un acto motor, mediante la observación y usar este acto motor de la misma forma que la persona de la cual ha sido observado [36]. Es importante remarcar que en ambos casos la imitación requiere de la capacidad de transformar actos sensoriales en actos motores [1].

La evidencia de que las neuronas espejo están involucradas en la imitación, se muestra mediante estudios con resonancia magnética funcional, en donde los voluntarios eran enfrentados a dos condiciones: “observación” y “observación-ejecución”. En base a los movimientos de los dedos, se obtuvo mayor activación en las tareas de imitación [37]. La activación cerebral en el proceso de la imitación se produce a nivel del giro frontal inferior y en el área de Broca cuando la acción a imitar presenta un objetivo específico [34]. Este mecanismo de imitación se encuentra segmentado en dos partes. El primer paso es la división de la acción motora a imitar y su correlación a gesto motor por parte del observador, esto es llevado a cabo por el sistema de neuronas espejo. La segunda parte es una

organización de estos movimientos y actos motores a nivel espacial y temporal para que el observador sea capaz de llevarlo a cabo. Esto se produce especialmente en el área 46 de Brodmann de la corteza prefrontal [1].

En el principio de la vida, los niños tienden a imitar el comportamiento como un espejo es decir en sentido contrario al del observador. Se observa que la zona frontal inferior de las neuronas espejo se activan de una manera más fuerte que cuando se imita de la manera correcta por ejemplo, al levantar la mano izquierda el imitador levanta también su mano izquierda. Esto nos lleva a la conclusión de que las neuronas espejo en lo relacionado con la imitación presentan una mayor influencia en las etapas tempranas de la vida.

En el sistema de imitación en el que participan las neuronas espejo, interviene la información visual procedente de la parte superior del lóbulo temporal y los componentes motores parietales y frontales que definen el acto motor que estamos imitando [38].

### ***Neuronas espejo y emociones***

Aun cuando no hay un acuerdo total con respecto a cuáles son las emociones primarias, algunos autores las categorizan en 5 apartados: amor, felicidad, enfado, tristeza y miedo [1]. Para otros como Darwin, el asco es una emoción básica presente en todos los seres humanos [39]. Las emociones nos sirven para comprender a las personas que nos rodean, puesto que pueden ser expresadas de múltiples formas, muecas, posturas corporales, etc.

La imitación no solamente se produce a nivel motórico, sino que también ocurre de forma automática cuando estamos interactuando a nivel social y emocional [40]. Esto se denomina efecto camaleón [41]. Las personas que tienden a imitar a otras suelen ser personas más empáticas, por lo que las neuronas espejo se han involucrado en la empatía. La empatía requiere una serie de procesamientos emocionales y la implicación del sistema límbico [40]. Y se fundamenta en hacer un sentimiento vivenciado por otro como propio, a través de la transformación de información visual. Las neuronas espejo serían uno de los sistemas cerebrales que nos ayudarían al proceso de la empatía [42].

El sistema de neuronas espejo y el sistema límbico, especialmente la amígdala, se encuentran anatómicamente conectadas por la ínsula [43]. La ínsula

es una estructura compleja formada por dos regiones funcionales: una sección anterior y una sección posterior. La sección anterior recibe información visual de la parte superior del lóbulo temporal así como de estructuras centrales olfativas y gustativas, e interviene en el control de las respuestas autonómicas y viscerales. Mientras la parte posterior recibe información auditiva, somatosensorial y de zonas premotoras [1].

La observación e imitación de caras las cuales expresan algún tipo de emoción provoca la activación de todo el sistema de neuronas espejo, así como de la ínsula y de la amígdala. Gracias a una serie de estudios de imagen cerebral [44] se vio que en humanos la observación de expresiones faciales relacionadas con disgusto provoca una activación en la parte anterior de la ínsula y en la zona anterior del córtex cingulado, que también forma parte del sistema límbico.

También se ha observado activación de la parte anterior de la ínsula y del córtex cingular anterior en situaciones relacionadas con el dolor [45, 46]. Esto se comprobó gracias a un estudio en el cual se presentan dos condiciones. En la primera, los participantes eran expuestos a un dolor de mediana intensidad producido en su mano. En la segunda, los participantes observaban como el mismo dolor le era provocado a una persona amada. Los resultados mostraron cómo las mismas zonas, ínsula y córtex cingular anterior, se activaban en ambas situaciones. Del mismo modo podemos observar activación en las áreas relacionadas con las neuronas espejo cuando se está observando una interacción social [47]. Reforzando la idea de que estas neuronas modulan la comprensión de una acción.

### ***Neuronas espejo y autismo***

El trastorno del espectro autista (TEA) es un trastorno heterogéneo del neurodesarrollo con grados y manifestaciones muy variables que tiene causas tanto genéticas como ambientales. Suele reconocerse en una fase temprana de la niñez y persiste hasta la edad adulta. No obstante, sus manifestaciones pueden modificarse en gran medida por la experiencia y la educación [48]. El TEA suele presentar graves trastornos en el lenguaje, en la creación y mantenimiento de los vínculos afectivos y en el reconocimiento de emociones [49, 50]. Este déficit afecta a varias estructuras nerviosas, incluyendo el córtex cerebral, cerebelo y tronco del encéfalo [51]. Dado que los distintos déficits que provoca el TEA están

íntimamente relacionados con las funciones que regulan las neuronas espejo, se ha propuesto que dichos déficits pueden deberse a alteraciones de este tipo de neuronas y de los mecanismos en los que participan [52, 53].

Mediante observación por EEG de los ritmos *mu*, los cuales están abolidos cuando una persona realiza un movimiento voluntario, se ha visto que también se encuentran suprimidos cuando una persona observa a otra realizar un movimiento. Los ritmos *mu* son actividades eléctricas generadas de forma espontánea en la corteza primaria sensoriomotora con una frecuencia que oscila entre 10 y 20Hz [40]. Exploraciones similares realizadas por Oberman y colaboradores [53] mostraron que los pacientes con autismo presentaban abolición de los ritmos *mu* durante la realización de un movimiento voluntario, pero no cuando observaban a alguien realizando una actividad.

Otros estudios han mostrado que durante la realización de tareas sociales, que conllevan la observación e imitación de expresiones faciales relacionadas con las principales emociones, en los niños con autismo la activación de las neuronas espejo era mucho menor en comparación a niños sanos. Además, se observó que a menor activación de estas neuronas más gravedad en la enfermedad sanos [40, 50, 52]. Tomando en conjunto estos resultados, parece ser que los niños con TEA tienen dañado el sistema de neuronas espejo.

Con anterioridad hemos hablado de que los actos motores se encuentran organizados en modo de cadena y que gracias a las neuronas espejo no es necesario ver todos los pasos de dicha cadena para llegar a la comprensión de un acto motor. Se ha comprobado que esta cadena se encuentra dañada en niños que presentan autismo [54]. Así, dos grupos de niños unos con autismo y otros sanos, se les presentó dos situaciones, agarrar un alimento para comerlo o agarrarlo para dejarlo en un envase y se registró la actividad de la musculatura milohioidea. En niños sanos se ve una activación de esta musculatura tan pronto como coge la comida, sin embargo en niños con espectro autista solo se observa la activación de esta musculatura cuando el alimento se va a llevar a la boca, lo cual nos indicaría que no son capaces de completar la cadena de los actos motores [50].

### ***Neuronas espejo y rehabilitación motora***

Los mecanismos de la neuroplasticidad cerebral permiten la compensación de déficits neurológicos gracias a la utilización de otras redes neuronales intactas. La rehabilitación basada en la plasticidad cerebral se utiliza tanto en Fisioterapia como en Terapia Ocupacional para la mejora de déficits motores.

Como hemos comentado, las neuronas espejo tienen la función de entender el porqué se produce un acto motor y así modular el comportamiento motórico relacionado con dicho acto. Lo cual es básico para la imitación de este acto y para el aprendizaje gracias a la imitación [55]. Se ha descrito que cuando se observa y se realiza al mismo tiempo un acto motor, el aprendizaje del mismo es más fuerte que si solamente se realiza el movimiento. Esto sugiere que las neuronas espejo participan además en la construcción de los recuerdos motóricos [56].

Las consecuencias de un ictus son entre otras la pérdida de diferentes inputs sensoriales llegados del propio cuerpo del paciente. Por ello es muy importante incrementar en la medida de lo posible la llegada de este tipo de inputs. Así, se ha propuesto la activación del sistema motor en pacientes con ictus mediante la observación y la imitación de una acción motora, que como visto anteriormente nos ayuda a crear recuerdos motóricos más duraderos en el tiempo.

Apoyándonos en las propiedades que presentan las neuronas espejo a nivel motor, como la adquisición de nuevas habilidades motoras, se ha comprobado que en pacientes que han sufrido un ictus, la utilización de la terapia de observación de actividades de la vida diaria o AVD que todos tenemos en nuestro repertorio motor pueden activar las neuronas espejo y provocar una mejora significativa en dichos pacientes, en combinación con el tratamiento fisioterapéutico adecuado. Estos resultados positivos fueron observados en pacientes con ictus los cuales presentaban cronificación de su estado, y llevaban 100 días de tratamiento fisioterapéutico [57]. La acción-observación presenta efectos positivos porque produce la reactivación de áreas motoras afectadas por el ictus y que contienen el mecanismo de ejecución “Acción- observación-acción” propio del ser humano y que se encuentra relacionado con el sistema de neuronas espejo en monos [58].

La imitación también juega un papel importante en diversos tratamientos relacionados con el lenguaje, donde ritmo, creación e inteligibilidad se encuentran afectados. Gracias a esto, se han desarrollado teorías relacionadas con la

percepción del habla [59] basados en el rol funcional que presenta el sistema de “observación-ejecución” del mismo [60]. Este sistema depende de la conexión entre la parte inferior del lóbulo parietal y la zona ventral de la región premotora, la cual posiblemente represente el sistema de neuronas espejo relacionado con el habla en el ser humano. Este sistema “observación-ejecución” puede presentar beneficios en pacientes con afasia provocada por ictus, sobretodo en la producción del lenguaje [58].

Basándose en el sistema “observación-ejecución” Small y colaboradores [58] diseñaron un programa de intervención denominado IMITATE. Este consiste en la observación en silencio de palabras y frases dichas en voz alta por 6 oradores diferentes, seguido de un periodo en el cual los participantes debían repetir de forma oral el estímulo. El tratamiento se efectuaba durante 90 minutos al día, a lo largo de 6 semanas y aumentando la dificultad de los estímulos de forma gradual. Mediante resonancia magnética funcional, se tomó registro antes y después de estas 6 semanas. Se pudo observar un aumento en las habilidades motoras orales, así como el inicio de la capacidad de imitación de palabras monosilábicas, bisilábicas, etc. [58].

Finalmente, y teniendo en cuenta las diversas propiedades de las neuronas espejo, es de esperar el desarrollo en un futuro de nuevas técnicas rehabilitadoras en Terapia Ocupacional y otras disciplinas mediante la utilización de la terapia de observación de actividades de la vida diaria.

## ***Conclusiones***

Las neuronas espejo han supuesto un gran descubrimiento en el campo de la neurociencia. Gracias al interés que despertó este descubrimiento se han llevado a cabo un gran número de experimentos donde se ha comprobado la importancia que presentan estas neuronas en aspectos tan diversos como la comprensión motora, el habla, la imitación, y las emociones. Además, su déficit se asocia al autismo. Finalmente, nuevas técnicas de rehabilitación, especialmente para el tratamiento del ictus, se están desarrollando teniendo en cuenta las propiedades de las neuronas espejo.

### ***Bibliografía***

1. Fabri-Destro M, Rizzolatti G. (2008). Mirror Neurons and Mirror Systems in Monkeys and Humans. *Physiology*. 23:171-179.
2. Rizzolatti G, Fabbri-Destro M, Cattaneo L. (2009). Mirror neurons and their clinical relevance. *Natural Clinical Practice Neurology*. 5:24-34.
3. Di Pellegrino G, Fadiga L, Fogassi L, Gallese V, Rizzolatti G. (1992). Understanding motor events: a neurophysiological study. *Exp Brain Res*. 91:176-180.
4. Gallese V, Fadiga L, Fogassi L, Rizzolatti G. (1996). Action recognition in the premotor cortex. *Brain*. 119:593-609.
5. Luppino G, Belmalih A, Borra E, Gerbella M, Rozzi S. (2005). Architectonics and cortical connections of the ventral premotor area f5 on the macaque. *Soc Neurosci Abstr*. 194:1.
6. Fogassi L, Ferrari PF, Gesierich B, Rozzi S, Chersi F, Rizzolatti G. (2005). Parietal lobe: from action organization to intention understanding. *Science*. 29:662-667.
7. Prather JF, Peters S, Nowicki S, Mooney R. (2008). Precise auditory-vocal mirroring in neurons for learned vocal communication. *Nature*. 451:305-310.
8. Cohen-Seat G, Gastaut H, Faure J, Heuyer G. Etudes experimentales de l' 'activite' nerveuse pendant la projection cinematographique. (1954). *Rev Int Filmologie*. 5:7-64.
9. Gastaut HJ, Bert J. (1954). EEG changes during cinematographic presentation (Moving picture activation of the EEG). *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 6:433-444.

10. Mukamel R, Ekstrom AD, Kaplan, Iacoboni M, Fried I. (2010). Single-neuron responses in humans during execution and observation of actions. *Current Biology*. 20:750-56.
11. Rizzolatti G, Sinigaglia C. (2006). *Los mecanismos de la empatía emocional*. Barcelona: Paidós Ibérica.
12. Cattaneo L, Rizzolatti G. (2009). The mirror neuron system. *Arch Neurol*. 5:557-560.
13. Rizzolatti G, Freund HJ. (2001). Action observation activates premotor and parietal areas in a somatotopic manner: an fMRI study. *Eur J Neurosci*. 13:400-404.
14. Umiltà MA, et al. "I know what you are doing": a neurophysiological study. (2001). *Neuron*. 32:91-101.
15. Rizzolatti G, Fabbri-Destro M. (2008). The mirror system and its role in social cognition. *Current Opinion in Neurobiology*. 18:179-184.
16. Ferrari PF, Gallese V, Rizzolatti G, Fogassi L. (2003). Mirror neurons responding to the observation of ingestive and communicative mouth actions in the monkey ventral premotor cortex. *Eur J Neurosci*. 17:1703-1714.
17. Gazzola V, Rizzolatti G, Wicker B, Keysers C. (2007). The anthropomorphic brain: the mirror neuron system responds to human and robotic actions. *NeuroImage*. 35:1674-1684.
18. Gazzola V, van der Worp H, Mulder T, Wicker B, Rizzolatti G, Keysers, C. (2007). Aphasics born without hands mirror the goal of hand actions with their feet. *Current biology*. 17:1235-1240.

19. Keysers C et al. (2003). Audiovisual mirror neurons and action recognition. *Exp Brain Res.* 153:628-636.
20. Iacoboni, et al. (2005). Grasping the intentions of others with one's own mirror neuron system. *Plos Biol* 3 e79.
21. Calvo-Merino B, Glaser DE, Grèzes J, Passingham RE, Haggard P. (2005). Action observation and acquired motor skills: an fMRI study with expert dancers. *Cereb Cortex.* 15:1243-1249.
22. Calvo-Merino B, Grèzes J, Glaser D, Passingham R, Haggard P. (2006). Seeing or doing? Influence of visual and motor familiarity in action observation. *Curr Biol.* 16:1905-1910.
23. Cross ES, de Hamilton AF, Grafton ST. (2006). Building a motor simulation de novo: observation of dance by dancer. *NeuroImage.* 31:1257-1267.
24. Soussignan R, Courtial A, Canet P, Danon-Apter G, Nadel J. (2011). Human newborns match tongue protrusion of disembodied human and robotic mouths. *Developmental Science.* 14:385-394.
25. Rizzolatti G, Sinigaglia C. (2010). The functional role of the parieto-frontal mirror circuit: Interpretations and misinterpretations. *Nat Rev.* 11:264-274.
26. Liberman AM, Cooper FS, Shankweiler DP, Studdert-Kennedy M. (1967). Perception of the speech code. *Psychol Rev.* 74:431-461.
27. Liberman AM, Mattingly IG. (1985). The motor theory of speech perception revised. *Cognition.* 21:1-36.
28. Oztop E, Kawato M, Arbib M. (2013). Mirror neurons: Functions, mechanisms and models. *Neurosci Letters.* 540:43-55.

29. Arbib MA. (2005). From monkey-like action recognition to human language: an evolutionary framework for neurolinguistics. *Behav Brain Sci.* 28:105-124.
30. Rizzolatti G, Arbib MA. (1998). Language within our grasp. *Trends Neurosci.* 21:188-194.
31. Fadiga L, Craighero L, Buccino G, Rizzolatti G. (2002). Speech listening specifically modulates the excitability of tongue muscles: a TMS study. *Eur J Neurosci.* 15:399-402.
32. Gentilucci M, Benuzzi F, Gangitano M, Grimaldi S. (2001). Grasp with hand and mouth: a kinematic study on healthy subjects. *J Neurophysiol.* 86:1685-1699.
33. Gentilucci M. (2003). Grasp observation influences speech production. *Eur J Neurosci.* 17:179-184.
34. Rizzolatti G, Craighero L. (2004). The mirror-neuron system. *Annu Rev Neurosci.* 27:169-92.
35. Prinz W. (2002). Experimental approaches to imitation. In: Meltzoff, A., Prinz, W., (Ed.), *The Imitative Mind: Development, Evolution, and Brain Bases* (pp.143–162). Cambridge: Cambridge University Press.
36. Tomasello M, Call J. (1997) *Primate cognition*. Oxford: Oxford University Press.
37. Iacoboni M, Woods RP, Brass M, Bekkering H, Mazziotta JC, Rizzolatti G. (1999). Cortical mechanisms of human imitation. *Science.* 286:2526-2528.
38. Krolak-Salmon P, et al. (2003). An attention modulated response to disgust in human ventral anterior insula. *Ann Neurol.* 53:446-453.

39. Darwin C. (1872). *The Expression of the Emotions in Man and Animals*: London, Murray, Culture et Civilisation.
40. Iacoboni M, Dapretto M. (2006). The mirror neuron system and the consequence of its dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 7:942-951.
41. Chartrand TL, Bargh JA. (1999). The chameleon effect: the perception-behavior link and social interaction. *J Pers Soc Psychol*. 76:893-910.
42. Avenanti A, Bueti D, Galati G, Aglioti SM. (2005). Transcranial magnetic stimulation highlights the sensorimotor side of empathy for pain. *Nat Neurosci*. 8:955-960.
43. Augustine JR. (1996). Circuitry and functional aspects of the insular lobes in primates including humans. *Brain Res Rev*. 2:229-294.
44. Small DM, Gregory M, Mak YE, Gitelman D, Mesulam MM, Parrish T. (2003). Dissociation of neuronal representation of intensity and affective valuation in human gustation. *Neuron*. 39:701-711.
45. De Vignemont F, Singer T. (2006). The empathic brain: how, when and why?. *Trends Cogn Sci*. 10:435-441.
46. Singer T, Seymour B, O'Doherty J, Kaube H, Dolan RJ, Frith CD. (2004). Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. *Science*. 303:1157-1162.
47. Iacoboni, et al. (2004). Watching social interactions produces dorsomedial prefrontal and medial parietal BOLD fMRI signal increases compared to a resting baseline. *NeuroImage*. 21:1167-1173.

48. Aliño JL, Miyar MV. (2008). DSM-IV-TR: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. American Psychiatric Pub. In Masson (ed). Trastornos generalizados del desarrollo (p80). Barcelona.
49. Hobson RP. (1993). *Autism and the Development of Mind*. Hillsdale: Erlbaum.
50. Rizzolatti G, Fabbri-Destro M. (2010). Mirror neurons: from discovery to autism. *Exp Brain Res*. 200:223-237.
51. Minshew NJ, Williams DL. (2007). The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neural organization. *Arch Neurol*. 64:945-950.
52. Dapretto M, et al. (2006). Understanding emotions in others: mirror neuron dysfunction in children with autism spectrum disorders. *Nat Neurosci*. 9:28-30.
53. Oberman LM, Hubbard EM, McCleery JP, Altschuler EL, Ramachandran VS, Pineda JA. (2005). EEG evidence for mirror neuron dysfunction in autism spectrum disorders. *Cog Brain Res*. 24:190-198.
54. Cattaneo L, et al. (2007). Impairment of actions chains in autism and its possible role in intention understanding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:17825-17830.
55. Buccino G, et al. (2004). Neural circuits underlying imitation learning of hand actions: an event-related fMRI study. *Neuron*. 42:323-334.
56. Stefan K, Classen J, Celnik P, Cohen LG. (2008). Concurrent action observation modulates practice induced motor memory formation. *Eur J Neurosci*. 27:730-738.
57. Ertelt D, et al. (2007). Action observation has a positive impact on rehabilitation of motor deficits after stroke. *NeuroImage*. 36:164-173.

58. Small SL, Buccino G, Solodkin A. (2012). The mirror neuron system and treatment of stroke. *Developmental Psychobiology*. 54:293-310.
59. Skipper JI, Nusbaum HC, Small SL. (2006). Lending a helping hand to hearing: A motor theory of speech perception. In: M. A. Arbib (Ed.), *Action to language via the mirror neuron system* (pp. 250-286). Cambridge: Cambridge University Press.
60. Skipper JI, Nusbaum HC, Small SL. (2005). Listening to talking faces: Motor cortical activation during speech perception. *NeuroImage*. 25:76-89.



## CAPÍTULO 7

### Tipos de tratamiento utilizados para la fibromialgia en Andalucía

Maire C, García-Leiva JM, Calandre EP

#### Resumen

**Introducción.** La fibromialgia es un síndrome cuya manifestación central es el dolor crónico generalizado, acompañado por fatiga crónica, problemas de sueño, problemas cognitivos, ansiedad y depresión entre los síntomas más frecuentes. Su tratamiento es sintomático y se realiza desde una perspectiva multidisciplinar. El objetivo del presente estudio fue analizar las pautas de tratamientos utilizados para la fibromialgia en Andalucía.

**Metodología.** Se desarrolló una encuesta en línea donde se recogieron datos sociodemográficos y clínicos, tipos de tratamiento seguidos, tanto farmacológicos como no farmacológicos, combinaciones terapéuticas y grado de satisfacción con las mismas.

**Resultados.** Se obtuvieron un total de 121 respuestas, pudiéndose observar un predominio del tratamiento multidisciplinar en el que se combinaba el tratamiento farmacológico con el ejercicio físico. Predominó la politerapia, siendo los fármacos más utilizados el tramadol y los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS). La eficacia autopercebida de los distintos tipos de tratamientos fue baja.

**Discusión.** La combinación de tratamiento no farmacológico y farmacológico se adecua a lo recomendado por las guías de

práctica clínica (GPC). La intensidad de los síntomas de la enfermedad fue moderada-alta, lo que justifica el uso del tratamiento farmacológico. El tratamiento psicológico fue el menos utilizado a pesar de su alto nivel de evidencia. Destacó el exceso de uso de tramadol e ISRS frente a la infrautilización de fármacos de primera elección como la amitriptilina, la pregabalina o la duloxetina. La baja satisfacción con todos los tipos de tratamientos podría deberse a unas expectativas inadecuadas del paciente en cuanto a los resultados esperados. La elevada proporción de reacciones adversas justificaría que el tratamiento farmacológico fuera el menos apreciado.

**Conclusión.** El tratamiento multidisciplinar seguido por los sujetos va en concordancia con las recomendaciones de las GPC. Sin embargo, las pautas de tratamiento farmacológico solo se adecuan parcialmente a estas.

## **Introducción**

La fibromialgia es un síndrome cuya manifestación central es el dolor crónico generalizado. El dolor se acompaña con una frecuencia muy alta de problemas de sueño, fatiga crónica, problemas cognitivos, rigidez muscular, depresión y/o ansiedad entre los síntomas observados con mayor frecuencia [1]. Asimismo, muestra una alta comorbilidad con un amplio abanico de enfermedades, tales como el síndrome del colon irritable, la depresión, la ansiedad, las jaquecas, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso o el síndrome de fatiga crónica entre otros [2].

La historia del diagnóstico de la fibromialgia puede remontarse a los inicios del siglo XVIII, con el empleo del término *reumatismo muscular*, para referirse a problemas musculares crónicos dolorosos en ausencia de una alteración fisiológica observable. En 1904, Gower acuñó el término *fibrositis*, que se utilizó durante la mayor parte del siglo XX hasta que Hensch, en 1976, introdujo el término de *fibromialgia* [3]. En 1990 el síndrome fue reconocido por el Colegio Americano de Reumatología (ACR), que estableció un primer criterio de clasificación en el que se requería para su diagnóstico, la existencia de dolor durante más de tres meses en, al menos, 11 puntos corporales de los 18 establecidos [4]. En 2010, el ACR estableció un criterio diagnóstico en el que sustituyó la cuantificación de los 18 puntos dolorosos por una evaluación general del dolor en zonas corporales más amplias y una valoración cuantitativa del espectro sintomático concomitante, a través de las escalas WPI y SS respectivamente [5]. Desde 2010 se han producido ligeras modificaciones del criterio; el ACR estableció en 2011 una escala de valoración de la severidad de la fibromialgia (escala FS) resultado de la suma de los valores de la escala WPI y SS [6] y en 2016, definió el dolor generalizado como dolor en al menos 4 o 5 áreas corporales y estableció que el paciente debía de presentar, para el diagnóstico de fibromialgia, un WPI  $\geq 7$  y un SS  $\geq 5$  ó un WPI entre 4 y 6 y un SS  $\geq 9$  [7].

En la patogenia de la fibromialgia intervienen tanto factores genéticos como ambientales. Los familiares directos de pacientes con fibromialgia presentan mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad y un mayor número de puntos dolorosos que los familiares de individuos sanos [8]. Algunos polimorfismos del

gen transportador de serotonina (5-HTT) y del gen catecol-O-metiltransferasa (COMT) parecen estar relacionados con su patogénesis [9]. Además, se han identificado alteraciones biológicas relevantes relacionadas con esta enfermedad en el eje hipotálamo-adrenal, en el funcionamiento del sistema nervioso autónomo, en la estructura del sueño y en la neurotransmisión dopaminérgica [10-13]. Con respecto a las influencias ambientales, se ven implicados factores físicos y psicológicos, tales como infecciones, traumatismos y abusos sexuales [14-15]. Según Yunus [16], la fibromialgia puede categorizarse dentro de las denominadas *enfermedades de sensibilización central*, que se caracterizan por un proceso patológico de sensibilización de las vías ascendentes y descendentes del dolor a nivel del sistema nervioso central. Este proceso de sensibilización explicaría algunas de las alteraciones anteriormente mencionadas, como las alteraciones del sueño o las alteraciones en la transmisión dopaminérgica, y se relacionaría con distintos síntomas de la enfermedad en función de las características biopsicosociales del paciente [16].

Según el estudio epidemiológico de Queiroz [17], la fibromialgia tiene una prevalencia en la población general adulta, a nivel mundial, de 2.7%. Este mismo estudio sitúa la media europea en 2.5% y la media española entre el 2.3 y 2.4%. Atendiendo a las características sociodemográficas, la fibromialgia es más frecuente en mujeres que en hombres, con una ratio de 3:1, y afecta en mayor medida a personas de mediana edad, que residen en zonas rurales y con un nivel educativo y económico bajo [17].

Con respecto al coste económico y al peso en la asistencia sanitaria del tratamiento de la fibromialgia en España, Sicras et al. [18], en un estudio retrospectivo de un año sobre 63.526 usuarios del sistema de salud en Barcelona, encontraron una diferencia significativa de 5.010€ entre el coste anual medio de un paciente con fibromialgia y el resto de pacientes que recurren a la asistencia sanitaria, con un valor medio de 8.654€ para los pacientes con fibromialgia y un valor medio de 3,265 para el resto de la población, teniendo en cuenta tanto costes sanitarios como no sanitarios. Los autores atribuyen esta diferencia al mayor uso de los recursos sanitarios, al mayor consumo de medicamentos, y al mayor número de bajas por enfermedad y jubilaciones anticipadas de los pacientes con

fibromialgia, lo que a su vez correlaciona positivamente con el grado de afectación de la fibromialgia en la calidad de vida de los pacientes. En este sentido, el estudio de Mas et al. [19], señala que las consultas de los pacientes con fibromialgia en España suponen entre el 10 y el 20 % de las consultas de reumatología, así como el 5-6% de las consultas de medicina general. Otro estudio [18], estima que el coste anual en España de un paciente con fibromialgia alcanza los 16.000\$.

La valoración a largo plazo de pacientes con fibromialgia muestra que el dolor y los demás síntomas que componen la enfermedad se mantienen estables a lo largo del tiempo. Además, la calidad de vida de los pacientes es baja y no mejora a lo largo de los años [21-22]. En este sentido, el estudio de Wigers [23] sobre el valor predictivo de la duración de los síntomas sobre el desarrollo de la enfermedad, concluye que la duración de los síntomas no tiene carácter predictivo respecto a la gravedad de los mismos.

Con respecto a los tipos de tratamientos recomendados para la fibromialgia, en este estudio hemos recogido las recomendaciones de las GPC de la European League Against Rheumatism (EULAR) de 2016 [24], de la Association of the Scientific Medical Societies in Germany (AMFW) de 2012 [25], de la guía israelí de 2013 [26] y de la Canadian Pain Society (CA) de 2012 [27], además de las recomendaciones del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad de España (MSE) del 2011 [28]. Todas las GPC así como las recomendaciones del MSE, coinciden en que el tratamiento debe establecerse en función de los síntomas que presenta cada paciente, y que el objetivo del mismo es fomentar el alivio de los síntomas y mejorar la calidad de vida del sujeto. Es imprescindible para poder alcanzar estos objetivos, informar al paciente con respecto a su enfermedad, ya que unas expectativas erróneas sobre el tratamiento, como por ejemplo alcanzar la eliminación total de los síntomas, podrían ser contraproducentes en el resultado de la intervención. Por este motivo es fundamental que se establezca una buena relación terapéutica entre el médico y el paciente [24-28].

El *tratamiento multicomponente*, donde se incluyen al menos dos tratamientos no farmacológicos, recoge altos niveles de evidencia en los estudios clínicos y tiene una gran fuerza de recomendación en todas las GPC [24-28]. Además, se recomienda que el tratamiento sea proactivo, fomentando la

percepción de autocontrol del paciente en el afrontamiento de la enfermedad [24-28].

Con respecto al tratamiento farmacológico, tanto la EULAR como la guía canadiense desaconsejan su uso si la afectación de los síntomas en la vida diaria es leve [24,27]. Pero si nos encontramos ante síntomas de intensidad moderada o alta, se recomienda iniciar el tratamiento farmacológico en dosis bajas, e ir incrementando la de forma gradual para minimizar los posibles efectos adversos [24,27]. Entre los fármacos más recomendados se encuentran los antidepresivos; la amitriptilina, un antidepresivo tricíclico, se recomienda en todas las GPC mencionadas [24-28]. La ciclobenzaprina, de estructura similar a la de los antidepresivos tricíclicos pero que se utiliza como relajante muscular, también aparece recomendada en casi todas las GPC analizadas [24,26-28], menos en la AMFW en la que se desaconseja su uso [25]. La duloxetina y el milnacipran, antidepresivos ambos inhibidores de la recaptación de noradrenalina y serotonina (IRNS), se recomiendan en todas las GPC [24,26-28], salvo en la AMFW que desaconseja el uso del milnacipran [25]. Los antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), tienen diferentes recomendaciones según la GPC analizada: la canadiense las recomienda [27], la alemana tiene una recomendación abierta al juicio del especialista, por un periodo corto de tiempo y en caso de comorbilidad con un trastorno depresivo o de ansiedad [25], y la de la EULAR se posiciona levemente en contra [24]; la recomendación del MSE es específicamente sobre la fluoxetina, y su recomendación es levemente a favor [28].

Los gabapentinoides (pregabalina y gabapentina), un tipo concreto de anticonvulsivos ligados de la unidad alfa<sub>2</sub>delta de los canales de Ca<sup>++</sup>, se recomiendan en todas las GPC, en dosis iniciales bajas con un incremento paulatino para evitar los efectos adversos [24-28].

Por lo que respecta al tramadol, un opioide suave con efectos sobre la recaptación de noradrenalina y serotonina, la EULAR aconseja su uso al igual que la guía canadiense, aunque esta última sólo en caso de que no responda a otros tratamientos [24,27]. La guía de la AMFW tiene una recomendación abierta al juicio del especialista [25]. En cuanto a los opioides fuertes, todas las GPC tienen

un fuerte consenso en contra de su uso en el tratamiento de la fibromialgia [24-28].

La guía canadiense desaconseja el uso de los AINE, salvo que la fibromialgia curse con enfermedades reumáticas asociadas, donde se administraría en dosis bajas y en periodos cortos de tiempo [27]. La guía de la EULAR se posiciona fuertemente en contra [24] y las demás GPC no los mencionan [25-26].

Para ver cómo se refleja lo expuesto anteriormente en la práctica clínica en España, sólo hemos encontrado un estudio de Rivera et al.[29], sobre las estrategias de prescripción y ajuste de fármacos seguidas a lo largo de 3 meses por reumatólogos en pacientes con fibromialgia en todo el territorio nacional. Los autores indican que, en la evaluación final de los pacientes, la mayoría tomaba antidepresivos, seguido de analgésicos, AINE, anticonvulsivantes y benzodiacepinas. Los autores no especifican los tipos de fármacos de cada grupo, pero si comparamos los resultados con las recomendaciones de las GPC, podemos señalar una infravaloración de los anticonvulsivantes, y un uso inadecuado de las benzodiacepinas y de los AINE para estos pacientes.

Considerando lo anteriormente expuesto; la cronicidad y estabilidad de los síntomas, la baja calidad de vida de los pacientes con fibromialgia, el número de personas que padecen esta enfermedad en nuestro país, el coste del tratamiento, las diferencias en las recomendaciones de las GPC y la escasa información sobre las pautas seguidas en la práctica clínica, nos parece importante saber cuál es la situación actual del tratamiento de la fibromialgia en la comunidad autónoma de Andalucía, motivo por el cual se llevó a cabo el presente trabajo.

## ***Material y Métodos***

Para recoger los datos, se elaboró un cuestionario de cumplimentación en línea a través de la aplicación de Google Drive.

El cuestionario incluyó datos sociodemográficos y clínicos, tipos de tratamiento utilizados tanto farmacológicos como no farmacológicos y grado de

satisfacción con los mismos. El cuestionario completo puede encontrarse en el siguiente enlace: <http://goo.gl/forms/UA07RKC6ks>.

La encuesta se difundió por internet a través de las redes sociales y asociaciones de fibromialgia en España; en este estudio se evaluaron exclusivamente las respuestas procedentes de Andalucía.

La muestra se conformó, por tanto, de sujetos mayores de edad, con diagnóstico de fibromialgia, procedentes de la comunidad autónoma andaluza. Se estableció un mínimo de cien respuestas procedentes de provincias andaluzas para la realización de este trabajo. El análisis de los resultados se realizó exclusivamente mediante estadística descriptiva.

## **Resultados**

Se obtuvieron un total de 121 respuestas. La **Tabla 1** detalla las características sociodemográficas de la muestra. Nos encontramos principalmente ante mujeres de mediana edad, con un nivel educativo medio-alto, que están casadas o tienen pareja de hecho y se encuentran trabajando fuera de casa, si bien destaca el hecho de que el 20,7% se encuentren dados de baja laboral o jubilados a causa de la enfermedad.

**Tabla 1.** Datos sociodemográficos (N=121)

<b>Edad en años</b>	
media±d.t.	49,7 ± 8,7
(rango)	(25 - 71)
<b>Sexo</b>	<b>N(%)</b>
Mujer	114 (94,2)
Hombre	7 (5,8)
<b>Estudios</b>	
Sin estudios	1 (0,8)
Primarios	28 (23,1)

Secundarios	48 (39,7)
Universitarios	44 (36,4)
<b>Estado civil</b>	
Casado/pareja de hecho	85 (70,2)
Separado/divorciado	18 (14,9)
Soltero	11 (9,1)
Viudo	7 (5,8)
<b>Situación laboral</b>	
Trabaja fuera de casa	49 (40,5)
Está en paro	24 (19,8)
Trabaja sólo en casa (tareas del hogar)	19 (15,7)
Jubilado por enfermedad	16 (13,2)
Baja laboral	9 (7,4)
Jubilado por edad	3 (2,5)
Estudiante	1 (0,8)

La **Tabla 2** muestra la frecuencia de las principales patologías asociadas de los sujetos.

**Tabla 2.** Patologías asociadas (N=121)

	<b>N (%)</b>
Trastorno depresivo	76 (62,8)
Síndrome de fatiga crónica	75 (62)
Trastorno de ansiedad	72 (59,5)
Artrosis	69 (57)
Síndrome de intestino irritable	66 (54,5)
Cefálea de tipo tensional	55 (45,5)
Disfunción témporo-mandibular	44 (36,4)
Migraña	43 (35,5)
Artritis reumatoide	27 (22,3)
Cistitis intersticial	17 (14)

Síndrome de sensibilidad química múltiple	14 (11,6)
Lupus eritematoso sistémico	3 (2,5)
Ninguna	2 (1,7)

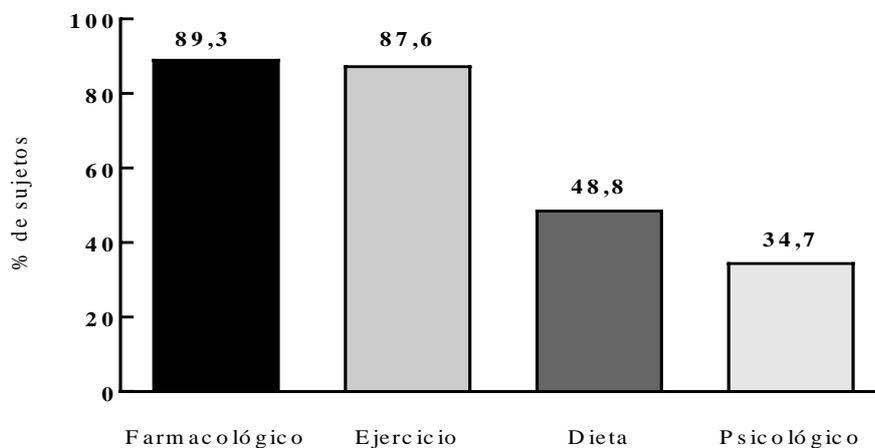
Los datos clínicos de la muestra se presentan en la **Tabla 3**. La mayoría de los sujetos indicaron un diagnóstico de la enfermedad desde hace más de 5 años. Con respecto a los síntomas asociados, señalaron que la fibromialgia interfiere de forma significativa en su vida cotidiana, que perciben una intensidad de dolor alta, que tienen una baja calidad de sueño y que tienen niveles de depresión y ansiedad moderados.

**Tabla 3.** Datos clínicos (N=121)

<b>Tiempo desde el diagnóstico</b>	<b>N (%)</b>	
Menos de 1 año	7 (5,8)	
Entre 1 y 5 años	31 (25,6)	
Más de 5 años	83 (68,6)	
<b>Síntomas asociados a la enfermedad*</b>	<b>media±d.t.</b>	<b>Rango</b>
Interferencia con la vida cotidiana	7,8 ± 2	(2 - 10)
Intensidad del dolor	7,2 ± 2,1	(2 - 10)
Calidad del sueño	3,8 ± 2,5	(1 - 10)
Depresión	5,9 ± 2,8	(1 - 10)
Ansiedad	6,4 ± 2,6	(1 - 10)

\*La intensidad percibida de los síntomas se ha medido en una escala de 1 a 10.

En la **Figura 1** se muestra la frecuencia de uso de los distintos tipos de tratamiento contemplados en nuestro estudio. El tratamiento farmacológico y el ejercicio físico fueron los tratamientos de elección en más del 85% de los casos, seguido de la realización de una dieta y del tratamiento psicológico en último lugar.



**Figura 1.** Tipos de tratamiento utilizados.

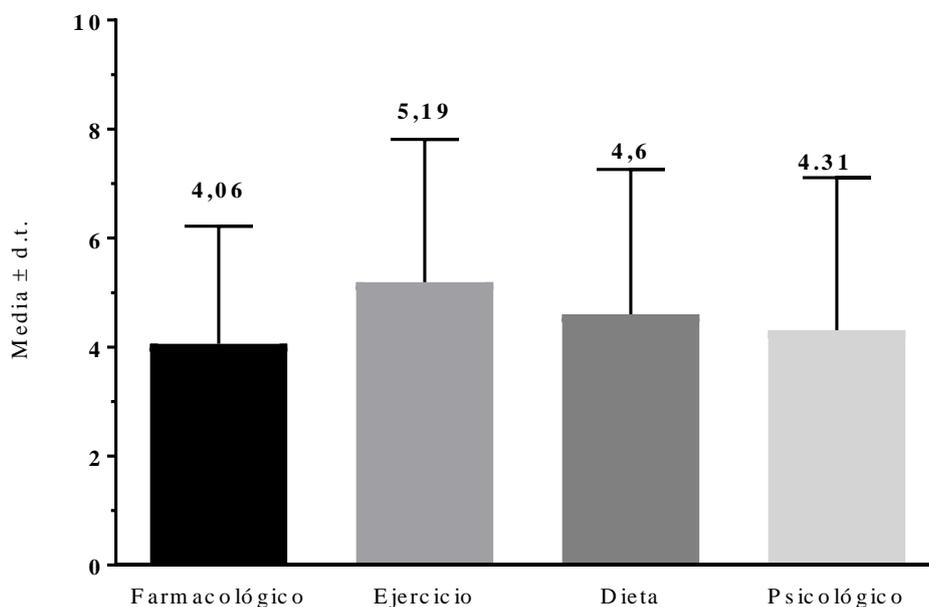
En la **Tabla 4** se pueden observar las combinaciones terapéuticas seguidas por los sujetos; la combinación de dos o tres tipos de tratamiento fue lo más frecuente, predominando la combinación del tratamiento farmacológico con el ejercicio físico en el primer caso, y la combinación del tratamiento farmacológico, con el ejercicio físico y una dieta en el segundo caso.

**Tabla 4.** Número de tratamientos y principales combinaciones (N=121)

	N/(%)
<b>Ninguno</b>	<b>1 (0,8)</b>
<b>Uno</b>	<b>14 (11,6)</b>
Farmacológico	7 (50)
Ejercicio	7 (50)
<b>Dos</b>	<b>41 (33,9)</b>
Farmacológico y ejercicio	31 (75,6)
Farmacológico y dieta	5 (12,2)
Ejercicio y dieta	3 (7,3)
Farmacológico y psicológico	2 (4,9)

<b>Tres</b>	<b>41 (33,9)</b>
Farmacológico, ejercicio y dieta	25 (61)
Farmacológico, ejercicio y psicológico	14 (34,1)
Ejercicio, dieta y psicológico	2 (4,9)
<b>Cuatro</b>	<b>24 (19,8)</b>

Como se puede observar en la **Figura 2**, el grado de satisfacción con los tratamientos, en una escala de 0 a 10, fue bajo y no existieron diferencias en la eficacia autopercebida de los mismos. El ejercicio físico fue el tratamiento mejor valorado mientras que el tratamiento farmacológico fue el que peor se valoró, apreciándose una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) respecto al ejercicio físico.



**Figura 2.** Satisfacción con los tratamientos.

En la **Tabla 5** se indican las frecuencias de uso de los fármacos pautados para la fibromialgia recogidos en el estudio. Podemos observar que destacó el uso del tramadol, seguido, a bastante distancia, por los ISRS, la amitriptilina y la

pregabalina. En la **Tabla 6** se muestran las dosis medias de administración de los mismos.

**Tabla 5.** Fármacos pautados(N=108)

<b>Fármaco</b>	<b>N (%)</b>
tramadol	55 (50,9)
ISRS	31 (28,7)*
amitriptilina	27 (25)
pregabalina	27 (25)
otros antidepresivos	24 (22,2)**
duloxetina	22 (20,3)
benzodiacepinas	20 (18,5)
trazodona	13 (12)
ciclobenzaprina	10 (9,2)
AINE	8 (7,4)
gabapentina	8 (7,4)
oxicodona	5 (4,6)
tramadol +paracetamol	4 (4,6)
fentanilo/buprenorfina	3 (2,7)
melatonina	3 (2,7)
tapentadol	2 (1,8)
quetiapina	2 (1,8)
ketamina	1 (0,9)
paracetamol	1 (0,9)

\*sertralina, fluvoxamina, citalopram, escitalopram, fluoxetina y paroxetina.

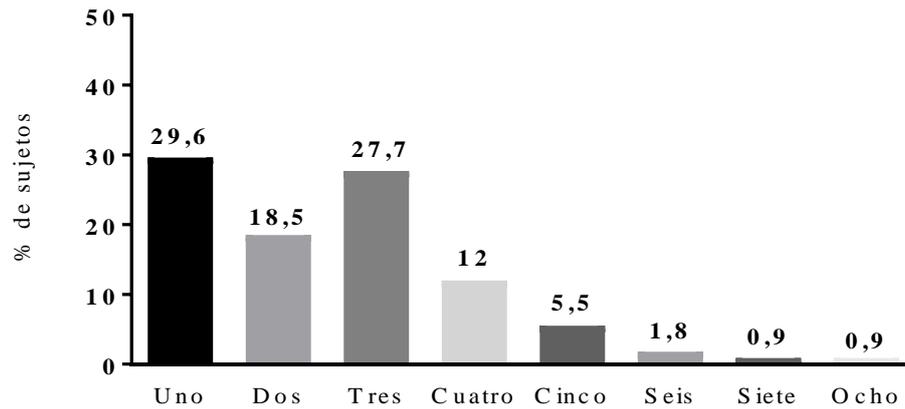
\*\*venlafaxina, desvenlafaxina, mirtazapina, bupropión y agomelatina.

**Tabla 6.**Dosis de los fármacos pautados.\*

<b>Fármaco</b>	<b>N</b>	<b>Media ± d.t</b>	<b>rango</b>
pregabalina	19	161,8 ±81,8	25-300
gabapentina	4	1275 ± 788,9	600-2400
duloxetina	18	60 ± 23	30-120
amitriptilina	18	41,6 ± 34,8	10-150
venlafaxina	9	158,3 ± 69,5	75-300
desvenlafaxina	2	100 ± 0	100-100
fluoxetina	8	32,5 ± 14,8	20-60
paroxetina	3	23,3 ± 5,7	20-30
citalopram	4	22,5 ± 5	20-30
escitalopram	3	8,3 ± 2,8	5-10
trazodona	9	111,1 ± 41,6	50-200
mirtazapina	4	30 ± 12,2	15-45
ciclobenzaprina	2	15 ± 7,0	10-20
tramadol	33	160,9 ± 99	37,5-400

\*En la tabla aparecen representadas las dosis de fármacos pautados seleccionadas tras descartar respuestas erróneas o en blanco, por lo que no han podido analizarse las dosis de todos los fármacos pautados del estudio.

En la **Figura 3** se indica el número de fármacos pautados prescritos simultáneamente: una cuarta parte de la muestra tomó un solo fármaco para el tratamiento de la fibromialgia predominando el uso simultáneo de tres fármacos entre los que reciben politerapia.



**Figura 3.** Número de fármacos prescritos simultáneamente.

El 71,2% (n=77) de los sujetos que se medican afirmaron tener reacciones adversas al tratamiento, siendo lo más común los síntomas de intolerancia gastrointestinal, tales como la diarrea, el estreñimiento, las náuseas o el dolor de estómago, seguido de somnolencia, mareos y problemas cognitivos. En la **Tabla 7** se detallan las reacciones adversas recogidas en el estudio.

**Tabla 7.** Reacciones adversas (N=108)

<b>Reacción adversa</b>	<b>N (%)</b>
Intolerancia gastrointestinal	46 (42,5)
Somnolencia	22 (20,3)
Mareos	18 (16,6)
Problemas cognitivos*	10 (9,2)
Sequedad	3 (2,7)
Problemas dermatológicos	3 (2,7)
Ansiedad	3 (2,7)
Aumento de peso	3 (2,7)
Parestesias	3 (2,7)
Visiones	2 (1,8)
Dependencia	2 (1,8)
Problemas cardiovasculares	2 (1,8)
Síndrome piernas inquietas	1 (0,9)
Temblor	1 (0,9)
Pérdida de apetito	1 (0,9)
Sudoración	1 (0,9)
Inapetencia sexual	1 (0,9)
Insomnio	1 (0,9)
Fatiga	1 (0,9)
Total	77 (71,2)

\* Los problemas cognitivos engloban problemas de memoria, de atención y de concentración.

En el 71% de los casos (n=77), fue el médico de familia el que prescribió el tratamiento farmacológico, seguido del reumatólogo (n=63; 58%), del psiquiatra (n=35; 32%) y de la unidad del dolor (n=25; 23%).

El 64,8% (n=70) de la muestra modifica el tratamiento farmacológico por su cuenta en función de su estado de salud.

Los fármacos mejor valorados por los sujetos fueron, por este orden, la pregabalina, el tramadol, los AINE, los ISRS, las benzodiacepinas, la duloxetina, la amitriptilina y el paracetamol.

## ***Discusión***

Los resultados muestran que nos encontramos mayoritariamente ante mujeres con dolor crónico generalizado de intensidad alta, acompañado de una baja calidad de sueño y una alta interferencia de la enfermedad en la vida cotidiana. En casi la totalidad de los casos, los sujetos presentaron enfermedades asociadas a la fibromialgia.

Se utilizaron varios tipos de tratamiento para la fibromialgia, destacando la combinación del ejercicio físico con el tratamiento farmacológico entre los que seguían dos tipos de tratamiento, y la combinación del ejercicio físico, mas el tratamiento farmacológico y la dieta entre los que seguían tres modalidades terapéuticas. En general, la satisfacción con los tratamientos fue baja, siendo el tratamiento farmacológico el peor valorado.

Los fármacos más utilizados fueron el tramadol (50,9%), los ISRS (28,7%), la amitriptilina (25%), la pregabalina (25%) y la duloxetina (20,3%). Predominó la politerapia, donde se prescribieron de forma simultánea varios fármacos, siendo dos o tres lo más frecuente. Más del 70% de los sujetos que tomaron un tratamiento farmacológico indicaron tener efectos adversos.

Según Jay y Barkin [1], la combinación de un tratamiento farmacológico y no farmacológico es el tratamiento más efectivo para la fibromialgia. Pero aún cuando la evidencia es clara a favor del manejo multidisciplinar de la enfermedad, con mejoras en la calidad de vida y descensos en los costes sanitarios, las carteras sanitarias suelen omitir este hecho [1]. Por lo que respecta al Servicio Andaluz de Salud, la cartera de servicios de atención primaria para la fibromialgia recoge un tratamiento integral del paciente basado en tres pilares; el tratamiento médico, el

ejercicio físico y la terapia educacional [30]. Sólo se deriva a un especialista (entre los que se encuentra el reumatólogo, el rehabilitador, el psicólogo y el fisioterapeuta) en caso de que se presenten patologías asociadas, dudas diagnósticas, o síntomas graves [30]. El protocolo establecido por el Sistema Andaluz de Salud podría explicar la elevada prevalencia de sujetos que indicaron realizar ejercicio físico en nuestro estudio, en combinación con el tratamiento farmacológico. Según Jay y Barking [1], los tratamientos con mayor nivel de evidencia dentro de las intervenciones no farmacológicas son el ejercicio físico y la terapia cognitivo conductual. A este respecto, es importante destacar que solo el 34% de la muestra afirmó recibir tratamiento psicológico para la fibromialgia, siendo el tipo de tratamiento menos utilizado. Una posible explicación a este hecho es que el protocolo de actuación de la Junta de Andalucía aconseja derivar al especialista sólo en casos de comorbilidad con depresión o ansiedad, o en caso de duda con el diagnóstico [30].

Con respecto al seguimiento de algún tipo de dieta, el protocolo de actuación de la Junta de Andalucía no tiene ninguna indicación al respecto [30], y tampoco aparece recomendada en ninguna de las GPC [24-28]. El elevado porcentaje de sujetos que señaló que sigue algún tipo de dieta puede deberse al seguimiento de un plan integral de vida saludable, lo cual sí viene recomendado en todas las GPC analizadas [25-28]. Como podemos ver en el estudio de Sicras et al. [18], el sobrepeso afecta al 41% de los pacientes con fibromialgia en España. Otro estudio de Mas et al. [20], estima que la obesidad en sujetos con fibromialgia es más frecuente que en la población normal, con una "odds ratio" de 0,9. No hay evidencia que avale la eficacia de un tipo específico de dieta, a parte del beneficio obtenido por la pérdida de peso [31], lo que podría explicar en parte, el alto porcentaje de dieta en nuestro estudio.

En relación a las estrategias de prescripción de fármacos seguidas por la muestra, el uso prioritario del tramadol y de los ISRS difiere de las recomendaciones de las GPC. En lo que se refiere al tramadol, la guía canadiense de 2016 advierte de los posibles efectos adversos del tratamiento crónico con opioides, y sólo lo recomienda en los casos en los que no haya respuesta a otras modalidades farmacológicas [27]. Igualmente, la fuerza de recomendación del MSE

de 2011 para el tramadol es baja [28]. La EULAR sí lo recomienda de forma leve en los casos en el que el dolor es severo [24]. Es importante resaltar que aunque el tramadol mejora el dolor, carece por completo de eficacia frente a otros síntomas frecuentemente asociados a la fibromialgia como el sueño no reparador, el cansancio, la ansiedad o la depresión.

Por lo que respecta a los ISRS, la guía del MSE de 2011 recomienda la fluoxetina de forma moderada [28], la EULAR del 2016 no aconseja los ISRS en general [24] y la guía alemana limita su uso para pacientes con depresión o ansiedad y durante un periodo corto de tiempo [25]. La guía israelí no tiene recomendación específica para los ISRS [26].

Las benzodiazepinas tampoco se recogen en la guía de práctica clínica europea, alemana ni canadiense [24-25,27]. El MSE las recomienda en combinación con un AINE, con una fuerza de recomendación baja y con un bajo nivel de evidencia (Grado D), cuando existe la sospecha de posibles generadores periféricos del dolor, como la artrosis y el dolor en partes blandas [28]. No obstante, las benzodiazepinas podrían haberse prescrito para el tratamiento de los síntomas asociados de la ansiedad y los problemas de sueño y no como tratamiento específico para la fibromialgia. La trazodona tampoco aparece en las GPC [24-28]; su prescripción podría, asimismo, haberse debido al tratamiento de problemas de sueño como síntoma asociado.

Existe un porcentaje de sujetos en nuestro estudio que tomaron AINE de forma pautada; a pesar de que el número no es elevado, es importante señalar que están fuertemente desaconsejados por las GPC [24-28]. La guía canadiense recomienda este tipo de medicamento sólo en caso de comorbilidad con osteoartritis, en bajas dosis y durante un periodo corto de tiempo [27].

Dentro de los fármacos más recomendados por las GPC destacan la amitriptilina, la pregabalina y los IRNS, dentro de este último grupo se encuentran la duloxetina y el milnacipran [24-28], este último no comercializado en España. En nuestra muestra podemos señalar una infrautilización de estos fármacos, especialmente con el uso minoritario de la duloxetina frente a los ISRS. La duloxetina se recomienda en la EULAR en caso de dolor severo [24], en la guía de la

AMFW tiene una alta recomendación en caso de comorbilidad con trastornos de ansiedad y depresión [25], el MSE recomienda la duloxetina para el tratamiento del dolor, de los problemas de sueño y del estado de ánimo [28], y la guía israelí recomienda los IRNS de forma general [26]. En lo que refiere a la amitriptilina, está recomendada en todas las GPC con un alto nivel de evidencia [24-28]. A pesar de ello, en nuestra muestra se usó la amitriptilina con menor frecuencia que el tramadol y los ISRS. Así mismo, la ciclobenzaprina, de estructura similar a los antidepresivos tricíclicos, también se recomienda en casi todas las GPC [24-28] pero su uso tampoco fue frecuente en nuestros sujetos. La pregabalina se utilizó en nuestra muestra en idéntico porcentaje que la amitriptilina. La pregabalina se recomienda por el MSE, con efectos sobre el dolor, la calidad de vida y el sueño [28]. La guía europea y la guía israelí también recomiendan este fármaco [24,26], y la guía alemana y canadiense la recomienda en dosis bajas [25,27].

Con respecto a las dosis de administración de estos fármacos, el rango de las dosis evaluadas de la amitriptilina para la fibromialgia se encuentra entre los 10 los 50 mg por día [32], la media de nuestro estudio fue por lo tanto correcta, con un valor medio de 41,6 mg al día. La duloxetina, tiene una dosis recomendada de entre 60 y 120 mg [28,32], por lo que la media de nuestros sujetos se encontró en el límite inferior de efectividad, 60 mg al día. Las dosis recomendadas de la pregabalina se encuentran entre los 300 y los 600 mg [32], por lo que la media de la muestra se encontró muy por debajo de la recomendada, lo que puede deberse a una mala tolerabilidad de la pregabalina que mantiene las dosis por debajo de las efectivas.

En cuanto al número de fármacos que se administran de forma pautada, la mayoría de los sujetos de nuestro estudio informó que tomaba dos o tres fármacos simultáneamente, aunque también existe un porcentaje apreciable de sujetos (29%), que recibió monoterapia. Los estudios clínicos realizados sobre la eficacia y seguridad del uso combinado de varios fármacos son escasos, por lo que las prescripciones de más de un fármaco suelen hacerse en base a la información sobre el efecto de los fármacos administrados como monoterapia [33]. Los autores de este trabajo sugieren que la monoterapia puede ser útil en aquellos pacientes en los que predomina el dolor en ausencia de otros síntomas o de patologías

asociadas, pero en los demás casos, es necesario más de un fármaco para el tratamiento de la compleja sintomatología de la enfermedad. Según Jay y Barkin [1], la sobremedicación y la politerapia indiscriminada son frecuentes en estos pacientes, a lo que hay que sumarle el hecho de que son sujetos muy sensibles a los efectos adversos de los medicamentos, en especial a los efectos de fatiga, de sedación y de problemas cognitivos. El 20% de la muestra informó que combinaba entre 4 y 8 fármacos, lo que podría suponer una sobremedicación para estos sujetos y relacionarse con el alto porcentaje de efectos adversos referidos.

La eficacia autopercibida de los distintos tipos de tratamiento fue baja en general, siendo el tratamiento farmacológico el peor valorado. Una posible explicación a la mala valoración del tratamiento recibido podría ser una expectativa inadecuada con respecto al resultado de la intervención, donde se espera un alivio total de los síntomas mientras que sólo se consigue una mejora parcial de los mismos. En concreto, para el tratamiento farmacológico, hay que añadir el posible efecto perjudicial de una politerapia excesiva unido a unas dosis inadecuadas de administración, lo que podría limitar el resultado terapéutico.

Este estudio es el primero que se realiza sobre las pautas de tratamiento farmacológico y no farmacológico seguidas en la población general con fibromialgia en Andalucía. Sólo hemos encontrado un estudio similar en España, sobre las pautas de tratamiento farmacológico seguidas en consultas de reumatología, de Rivera et al. en 2012 [29], con un resultado distinto al nuestro. Los fármacos más frecuentes encontrados en el estudio de Rivera et al. fueron los antidepresivos, los analgésicos, los AINE, los anticonvulsivantes y las benzodiazepinas por este orden. Es complicado comparar estos resultados con nuestro estudio, ya que los autores no especifican los tipos de analgésicos, antidepresivos y anticonvulsivantes analizados, pero sí podemos destacar la diferencia en el uso predominante del tramadol en nuestro estudio. El número de fármacos utilizados por los sujetos para tratar la fibromialgia en el estudio de Rivera et al. es de  $3,1 \pm 1,6$  fármacos por paciente en la visita inicial, mientras que en nuestro estudio, son más frecuentes los sujetos que sólo toman un fármaco pautado para el tratamiento de la fibromialgia (29,6%), aunque dentro de la politerapia, destaca el uso combinado de 3 fármacos (27,7%).

Una limitación de nuestro estudio es la imposibilidad de verificar la veracidad de los datos proporcionados por los sujetos, al tratarse de una encuesta en línea en la que no se puede hacer una selección activa de los sujetos. Además, podría haber un sesgo en la muestra, debido a que solamente los sujetos con un nivel educativo medio, con acceso a internet y en contacto con asociaciones y grupos sociales en red pueden responder a la encuesta. Otra limitación es que no podemos relacionar los efectos adversos recogidos en la encuesta con los fármacos específicos que los originan. Además, sólo hemos podido recoger las dosis de aquellos fármacos que han sido indicados adecuadamente por los sujetos, por lo que no tenemos una valoración de las dosis administradas de todos los fármacos recogidos en el estudio.

### ***Conclusión***

El perfil de la muestra se caracteriza por mujeres con un diagnóstico de fibromialgia desde hace más de cinco años, con una alta intensidad de dolor, con una baja calidad de sueño y con una afectación de la enfermedad que interfiere en su actividad de la vida diaria. Las últimas actualizaciones de las GPC defienden la combinación de al menos dos tipos de tratamiento no farmacológico para la fibromialgia y la adición del tratamiento farmacológico en los casos donde exista una sintomatología moderada o severa. Con lo que podemos concluir que las estrategias de tratamiento globales seguidas en nuestro estudio, con un uso mayoritario de la terapia interdisciplinar, se ajustan a las recomendaciones de las GPC. Las pautas de tratamiento farmacológico seguidas en nuestro estudio difieren de las recomendaciones de las GPC en cuanto al uso de los fármacos de primera línea, tanto en su frecuencia de uso como en las bajas dosis de administración. En general la satisfacción con los tratamientos fue baja, siendo el tratamiento farmacológico el peor valorado.

## ***Bibliografía***

1. Jay G, Barkin R. (2015). Fibromyalgia. *Dis Mon.* 61: 66-111.
2. Weir P, Harlan G, Nkoy F, et al. (2006). The incidence of fibromyalgia and its associated comorbidities. *J Clin Rheumatol.* 12: 124-128.
3. Inanici F, Yunus M. (2004). History of fibromyalgia: Past to present. *Curr Pain Headache Rep.* 8: 369-378.
4. Wolfe F, Smythe H, Yunus M, et al. (1990). The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 33: 160-172.
5. Wolfe F, Clauw D, Fitzcharles M, et al. (2010). The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res.* 62: 600-610.
6. Wolf F, Clauw D, Fitzcharles M, et al. (2011). Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: A modification of the ACR preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia. *J Rheumatol.* 38: 1113-1122.
7. Wolf F, Clauw D, Fitzcharles M, et al. (2016). Revision to the 2010/2011 fibromyalgia diagnostic criteria. *Semin Arthritis Rheum.* 46: 319-329.

8. Arnold L, Fan J, Russell I, et al. (2013). The fibromyalgia family study: a genome-wide linkage scan study. *Arthritis Rheumatol.* 65: 1122-1128.
9. Bradley L. (2009). Pathophysiology of fibromyalgia. *Am J Med.* 122: S22-S30.
10. Moldofsky H. (2008). The significance, assessment, and management of nonrestorative sleep in fibromyalgia syndrome. *CNS Spectr.* 13: 22-26.
11. Di Franco M, Iannuccelli C, Valesini G. (2010). Neuroendocrine immunology of fibromyalgia. *Ann N Y Acad Sci.* 1193: 84-90.
12. Staud R. (2008). Autonomic dysfunction in fibromyalgia syndrome: Postural orthostatic tachycardia. *Curr Rheumatol Rep.* 10: 463-466.
13. Wood P B, Holman A J. (2009). An elephant among us: the role of dopamine in the pathophysiology of fibromyalgia. *J Rheumatol.* 36: 221-224.
14. Al-Allaf A. (2002). A case-control study examining the role of physical trauma in the onset of fibromyalgia syndrome. *Rheumatology.* 41: 450-453.
15. Buskila D, Atzeni F, Sarzi-Puttini P. (2008). Etiology of fibromyalgia: The possible role of infection and vaccination. *Autoimmun Rev.* 8: 41-43.

16. Yunus M. (2008). Central Sensitivity Syndromes: A new paradigm and group nosology for fibromyalgia and overlapping conditions, and the related issue of disease versus illness. *Semin Arthritis Rheum.* 37: 339-352.
  
17. Queiroz, L. (2013). Worldwide epidemiology of fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep.* 17.
  
18. Sicras A, Rejas J, Navarro R, et al. (2009). Treating patients with fibromyalgia in primary care settings under routine medical practice: a claim database cost and burden of illness study. *Arthritis Res Ther.* 11: R54
  
19. Mas A J, Carmona L, Valverde M, et al. (2008). Prevalence and impact of fibromyalgia on function and quality of life in individuals from the general population: result from a nationwide study in Spain. *ClinExpRheumatol.* 26: 519-526.
  
20. Rivera J, Rejas-Gutiérrez J, Vallejo M et al. (2012). Prospective study of the use of healthcare resources and economic costs in patients with fibromyalgia after treatment in routine medical practice. *ClinExpRheumatol.* 30: 31-38.
  
21. Felson D, Goldenberg D. (1986). The natural history of fibromyalgia. *Arthritis Rheumatol.* 29: 1522-1526.

22. Wolfe F, Anderson J, Harkness D, et al. (1997). Health status and disease severity in fibromyalgia. Results of a six-center longitudinal study. *Arthritis Rheum.* 40: 1571-1579.
  
23. Wigers S. (1996). Fibromyalgia outcome: The predictive values of symptom duration, physical activity, disability pension, and critical life events—A 4.5 year prospective study. *JPsychosomRes.* 41: 235-243.
  
24. Macfarlane G, Kronisch C, Dean L, et al. (2016). EULAR revised recommendations for the management of fibromyalgia. *Ann RheumDis.* 0: 1-11.
  
25. Eich W, Häusser W, Arnold B, et al. (2012). Fibromyalgia syndrome, definition, classification, clinical diagnosis and prognosis. *Schmerz.* 26: 247-258.
  
26. Ablin J, Fitzcharles M, Buskila D, et al. (2013). Treatment of fibromyalgia syndrome: recommendations of recent evidence-based Interdisciplinary guidelines with special emphasis on complementary and alternative therapies. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013: 1-7.
  
27. Fitzcharles M, Ste-Marie P, Goldenberg D, et al. (2016). Management | Canadian Guidelines for the Diagnosis and Management of Fibromyalgia [Internet]. *Fmguidelines.ca.* [cited 13 September 2016]. Available from: [http://fmguidelines.ca/?page\\_id=21](http://fmguidelines.ca/?page_id=21)

28. Fibromialgia. (2011). Madrid: Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad.152 pags.
  
29. Rivera J, Vallejo M, Esteve-Vives J. (2012). Estrategias de prescripción de fármacos en el tratamiento de pacientes con fibromialgia. *ReumatolClin.* 8: 184-188.
  
30. FIBROMIALGIA: proceso asistencial integrado. (2005). Sevilla: Junta de Andalucía, Conserjería de Salud; 120 pags.
  
31. Slim M, Calandre E P, Rico-Villademoros F. (2015). An insight into the gastrointestinal component of fibromyalgia; clinical manifestations and potential underlying mechanisms. *Rheumatol Int.* 35: 433-444.
  
32. Calandre E P, Rico-Villademoros F. (2012). The role of antipsychotics in the management of fibromyalgia. *CNS Drugs.* 26:135-153.
  
33. Calandre E, Rico-Villademoros F, Rodríguez-López C. (2012). Monotherapy or Combination Therapy for Fibromyalgia Treatment?. *Curr Rheumatol Rep.* 14:568-575.



## CAPÍTULO 8

# Influencia de la microbiota intestinal sobre el neurodesarrollo y la obesidad en el niño

Cerdó T, Campoy C

### Resumen

Hay períodos críticos durante el embarazo y la vida temprana donde el neurodesarrollo del niño puede ser alterado por diferentes factores incluyendo hormonas, estrés, genética y dieta. En este sentido, es cada vez más evidente que el establecimiento de la comunidad microbiana intestinal, en la primera etapa de vida del niño, desempeña un papel importante en el desarrollo infantil y la susceptibilidad de sufrir una enfermedad a lo largo de la vida. Durante la última década, los nuevos estudios en animales y humanos han identificado asociaciones entre las bacterias intestinales y el metabolismo del huésped con la obesidad materna, que podrían influir en el desarrollo neurológico del niño. Sin embargo, los mecanismos exactos no se conocen y son necesarios estudios más profundos para poder encontrarlos. Los resultados de este estudio mostrarán una recopilación de los últimos avances en la microbiota intestinal y el neurodesarrollo, sugiriendo mecanismos potenciales para su intervención.

## ***Introducción***

La obesidad se ha convertido en una epidemia mundial que afecta negativamente a la salud de millones de personas. El aumento de la prevalencia de obesidad en adultos jóvenes es paralelo al aumento de la prevalencia de sobrepeso, obesidad y diabetes durante la gestación. Se han confirmado numerosos efectos adversos determinados por estas patologías en la salud de la madre y de su descendencia, por lo que actualmente se ha convertido en un tema de gran interés científico [1].

Se sabe que la obesidad está asociada, entre otros factores, con una mayor resistencia a la insulina. Así, al principio del embarazo, las madres obesas son más resistentes a la insulina que las mujeres delgadas. Estas condiciones metabólicas pueden conllevar posibles efectos adversos en el feto, influyendo en las etapas de implantación y desarrollo placentario [2]; recientemente se ha comprobado que la obesidad y/o diabetes materna pueden contribuir a una disbiosis en la madre que determina una alteración de la composición y función de la microbiota intestinal en su hijo. Se especula que esta alteración de la microbiota intestinal puede tener un impacto en el desarrollo neurológico del niño y aumentar el riesgo de sufrir obesidad durante la infancia o en la vida adulta [3].

Hasta ahora, los estudios centrados en los orígenes de la obesidad estaban orientados hacia los excesos de la dieta o los genes del individuo [4]. Estudios experimentales indican una función importante de la microbiota intestinal en la estimulación de la obesidad y el neurodesarrollo [5]. Algunos Phylum y Clases de bacterias son capaces de metabolizar los nutrientes de manera más eficiente que otros, mejorando la producción de energía utilizable para el huésped y aumentando la absorción de calorías de la dieta, contribuyendo a un aumento de grasa corporal [6].

Una disbiosis de la microbiota intestinal puede inducir alteraciones fisiológicas e inmunológicas que favorecen la inflamación. Esta inflamación contribuirá a la pérdida de la barrera intestinal, causando la translocación de los componentes bacterianos patógenos a la circulación sistémica desde la mucosa intestinal. Estos componentes activan el sistema inmune innato, que produce citoquinas pro-inflamatorias, lo que conduce a un dolor visceral, deterioro de la

función del sistema nervioso central (SNC), y alteraciones en la neuroquímica, la cognición, el comportamiento y la respuesta al estrés [7].

Las implicaciones para la salud a nivel de la población son importantes y los estudios futuros sobre este tema estarán dirigidos hacia la identificación de las bacterias activas que causan la disbiosis en la comunidad microbiana intestinal, con el fin de diseñar estrategias terapéuticas para la protección a largo plazo contra la obesidad y para evitar las alteraciones del neurodesarrollo en los hijos de madres obesas o diabéticas y el avance precoz del deterioro neurológico en la vida adulta.

### ***La microbiota intestinal en las etapas tempranas del niño***

Recientemente, el papel de la microbiota intestinal durante el embarazo ha ganado una considerable atención en la comunidad científica. Se han observado cambios en la composición de la microbiota intestinal a lo largo de la gestación, que comienzan en el primer trimestre [8]. Además se ha visto que durante el tercer trimestre del embarazo en mujeres sanas, la microbiota intestinal muestra signos de inflamación, adiposidad e insensibilidad a la insulina de manera similar a la de las mujeres obesas [9]. Hasta hace poco, la placenta se había considerado un órgano estéril, pero actualmente conocemos la presencia de una comunidad bacteriana en el líquido amniótico y en la placenta [10-12]. Esta comunidad consiste en bacterias no patógenas de los Phylum *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* y *Tenericutes*, destacando que en función del tipo de composición puede haber un vínculo con el parto prematuro, lo que pone en relieve la importancia de la diafonía interna entre la microbiota y la mujer embarazada [10]. De hecho, se han observado cambios en el perfil del microbioma placentario en asociación con el bajo peso al nacer en embarazos a término [13]. Además, la disbiosis materna durante la gestación de mujeres obesas podría tener un papel importante en la colonización temprana y en el establecimiento de la microbiota intestinal humana en las primeras etapas de la vida, modificando el desarrollo del comportamiento y de las funciones cognitivas en los hijos [14]. Todos estos estudios indican que la funcionalidad y composición de la microbiota

intestinal pueden tener implicaciones relevantes para la salud materna y fetal, y donde se vislumbran importantes aplicaciones clínicas. Sin embargo, queda mucho por aclarar, ya que las implicaciones de la exposición microbiana prenatal son actualmente desconocidas y su relación con el desarrollo de enfermedades y el neurodesarrollo son áreas emergentes muy prometedoras.

### ***Alimentación postnatal***

Tras el nacimiento, el intestino del bebé se coloniza en pocas horas tras el contacto con el canal del parto, la microbiota de la piel materna (cesárea) y el medio ambiente [15]. Las primeras semanas de vida son muy importantes para la colonización intestinal, habiéndose identificado que factores como el tipo de alimentación, la edad gestacional, la hospitalización o el uso de antibióticos, entre otros, estarían implicados en el desarrollo precoz del patrón estructural del microbioma intestinal [16]. De entre los factores mencionados cabe destacar la leche humana que es abundante en componentes bioactivos que contribuyen a mejorar la función cognitiva de los niños respecto a los alimentados con fórmula infantil, probablemente mediante la modulación de la composición y función de la microbiota intestinal [17].

En los últimos años, la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM), compuesta por los componentes típicos de membranas biológicas como fosfolípidos, colesterol o glicolípidos, ha ido ganando el interés científico debido a sus efectos positivos potenciales sobre la salud, tales como el mejor desarrollo cerebral [18]. Se ha comprobado que la suplementación de fórmulas infantiles con MFGM favorece la reducción de la diferencia en el rendimiento cognitivo a los 12 meses de edad entre lactantes alimentados al pecho de sus madres y aquellos alimentados con fórmula infantil [19]. Otra función de la MFGM es proporcionar efectos antimicrobianos, como la mucina, para disminuir la adherencia de *Yersinia enterocolitica* a las membranas intestinales o la butirofilina, responsable de la formación / secreción de las gotas lipídicas [20].

Los bebés alimentados con fórmula muestran una curva de ganancia de peso mayor entre los 3 y los 12 meses de edad, presentando un mayor riesgo a largo

plazo de obesidad, hipertensión, diabetes tipo 1 y 2 [21]. Además, se ha visto que la comunidad de microbiota de lactantes alimentados con fórmula, en comparación con los lactantes amamantados, presenta más anaerobios facultativos pertenecientes a *Bacteroides* y *Clostridium*. Aunque se creía que los *Bifidobacterium* estaban en mayor proporción en lactantes alimentados con fórmula que en lactantes amamantados, diversos estudios han planteado discusión sobre los niveles reales [22].

Un estudio sobre patrones de colonización microbiana en ratones BALB/cOlaHsd, confirmó que el uso de poliaminas en ratones alimentados con fórmula, minimizaba las diferencias con ratones amamantados. Los efectos de las poliaminas pueden mejorar la función de la barrera y la modulación del desarrollo del sistema inmune, regulando los niveles de *Akkermansia muciniphila* y *Bifidobacterium spp* [23]. Estos hallazgos deben ser estudiados en humanos.

Aunque hoy en día las fórmulas infantiles han evolucionado mucho, aún no se ha conseguido obtener una fórmula que proporcione los mismos beneficios que la leche materna. Por lo tanto, es necesario continuar estudiando la composición de la leche materna, para lograr los mismos efectos beneficiosos observados en la descendencia.

### ***Obesidad-inflamación y neurodesarrollo***

La definición de la inflamación consiste en una respuesta fisiológica normal a una amenaza infecciosa o lesión tisular, que conduce a la reparación, resolución y restauración del equilibrio homeostático [24]. El estado inflamatorio crónico de la obesidad, sin embargo, tiene consecuencias diferentes que resultan en un mal funcionamiento crónico de los tejidos y un cambio del "equilibrio" normal para adaptarse a nuevas condiciones fisiológicas o metabólicas [25].

Se ha demostrado en ratones, que la obesidad durante el embarazo interrumpe la inflamación a través del aumento de la activación de los macrófagos y la elevación de la expresión génica de las citoquinas, proporcionando posibles vínculos entre la inflamación placentaria y la programación de una posible

enfermedad en la descendencia a consecuencia de la obesidad materna [26]. Estudios recientes sugieren que el ambiente inflamatorio intrauterino está asociado con alteraciones del desarrollo neurológico en los hijos [27]. Los mecanismos del desarrollo neurológico del niño son una compleja combinación de programación genética, ambiental e intrauterina, y los efectos del ambiente prenatal sobre el desarrollo del cerebro fetal y la salud mental futura del bebé, aún son desconocidos. En una revisión reciente [28] se han resumido diferentes hipótesis sobre cómo la obesidad materna podría influir en los resultados fetales, neonatales y posteriores del neurodesarrollo al aumentar el riesgo de inflamación sistémica y cerebral. Sin embargo, los mecanismos implicados en las alteraciones del neurodesarrollo observadas en los hijos de madres obesas, por el momento son desconocidos [29]. De todos estos estudios, podemos deducir que un mejor control de la obesidad materna podría conducir a importantes beneficios para el funcionamiento cognitivo y mental del niño.

### ***PPAR $\gamma$ -microbiota-neurodesarrollo***

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son miembros de la superfamilia de factores de transcripción de receptores nucleares que tienen papeles diversos e importantes en la regulación de procesos de desarrollo, reproductivos, homeostáticos, inflamatorios, inmunes y metabólicos [30,31]. Se han identificado tres isoformas (PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\delta$  -también conocido como PPAR- $\beta$ - y PPAR- $\gamma$ ), codificadas por genes separados, en diferentes distribuciones tisulares y que parecen tener funciones biológicas distintas pero superpuestas [32]. Los PPAR han sido identificados en muchas especies, incluyendo humanos y roedores [33].

Una de las funciones más importantes de los PPAR es el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa intestinal, y recientemente se ha visto que el PPAR está implicado en eventos moleculares involucrados en los efectos mediados por los probióticos [34]. El PPAR  $\gamma$  está altamente expresado en el colon, alcanzando niveles similares al tejido adiposo [35]. Su expresión sigue una tendencia en aumento desde el eje proximal hasta el distal, y puede encontrarse principalmente

en células epiteliales intestinales (IEC) y, en menor grado, en monocitos/macrófagos y linfocitos [36]. Este receptor tiene diferentes funciones de motilidad y diferenciación de células epiteliales a mecanismos homeostáticos, tales como proliferación, integridad epitelial y, más específicamente, regulación de la inflamación inducida por bacterias de las mucosas [37]. Se ha visto que ciertas bacterias, como *Bacteroides thetaiotaomicron*, activan la expresión de las citoquinas mediante la exportación nuclear de la subunidad RelA NF-kappaB, a través de una vía dependiente de PPAR- $\gamma$ , desencadenando un mecanismo antiinflamatorio [38].

Varios estudios se han centrado en el papel anti-inflamatorio de PPAR  $\gamma$  en el proceso de diversas enfermedades inflamatorias intestinales. Una comparación entre controles y pacientes con enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (UC), mostró una disminución significativa en los genes pertenecientes a este receptor en el grupo de remisión que padecían UC y en controles comparándolos con los pacientes que presentaban CD [39].

La expresión de PPAR $\gamma$  inducida por diversos estímulos como la presencia de ciertas bacterias, puede conducir a la activación de células pertenecientes al sistema inmune innato y adaptativo, desencadenando ciertas vías que pueden influir en diversos procesos fisiológicos implicados en el desarrollo neurológico durante el embarazo [40]. Varios estudios muestran que los tres isotipos PPAR se expresan en todos los tipos celulares del cerebro [41]. Estudios en ratas han demostrado que los isotipos PPAR se co-expresan en el sistema nervioso durante la embriogénesis tardía, entre los días 13,5 y 18,5 de gestación. Las diferencias entre los tres isotipos PPAR son que PPAR  $\beta / \delta$  sigue siendo altamente expresado en este tejido, pero el PPAR  $\alpha$  y  $\gamma$  disminuyen en el cerebro tras el parto [42]. Igualmente, se ha demostrado que la restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) en ratas induce una disminución en la expresión de PPAR  $\gamma$ , promoviendo la reducción de los genes de señalización Wnt. Esto puede contribuir a la alteración de la composición celular del hipocampo, que a su vez, puede determinar una alteración del neurodesarrollo y posterior deterioro neurocognitivo en la descendencia [43].

Un estudio en niños a los 18 meses de vida, encontró que los bebés de las madres con el genotipo salvaje de PPAR $\gamma$  y Pro12 presentaban un mayor desarrollo cognitivo, lingüístico y motor, pero no en el socio-emocional comparado con los que portaban el alelo Ala. Este polimorfismo se ha asociado con obesidad, diabetes mellitus tipo II, deterioro cognitivo y enfermedad neurodegenerativa [44].

Un punto importante a destacar es la capacidad que tiene PPAR $\gamma$  de reducir la expresión de citoquinas y la oxido nítrico sintasa (iNOS) pro-inflamatorias en diversas células del cerebro y del sistema inmunológico (macrófagos, células microgliales y monocitos), influyendo en diferentes enfermedades neuronales como la enfermedad de Alzheimer (AD), donde iNOS contribuye a su neurotoxicidad [45]. Se sabe que PPAR $\gamma$  regula los procesos inflamatorios en el sistema nervioso central, pero diversos agonistas, como el RSG y la pioglitazona, pueden influir en esta vía que conduce a efectos neuroprotectores contra los trastornos neurológicos y neurodegenerativos [46]. Los estudios mencionados anteriormente ponen de relieve la importancia del PPAR $\gamma$  en relación con la inflamación y la etapa embrionaria, donde varios procesos pueden causar un desarrollo neurológico deficiente estando influenciado por la microbiota intestinal.

### ***Relación de la microbiota y el comportamiento alimentario asociado a la obesidad***

Se ha visto que la ingesta alimentaria puede conducir a varias enfermedades incluyendo obesidad, diabetes, enfermedades del corazón y cáncer, entre otras. Una nueva vía para controlar las enfermedades relacionadas con la nutrición perjudicial, como son la obesidad o el síndrome metabólico, se basa en la influencia del cerebro en el comportamiento alimentario, implicando la composición y la funcionalidad de la microbiota intestinal. Este enfoque microbiano podría cambiar la forma en que estos trastornos pueden ser investigados y evitados.

Se ha sugerido que una menor diversidad en la microbiota intestinal podría estar asociada con un comportamiento alimentario no saludable y a un mayor riesgo de obesidad [47]. La microbiota del intestino consiste en una comunidad compleja formada por trillones de bacterias, donde su composición va a depender

de la edad, sexo, familia, geografía y etnicidad del huésped [45,49] y puede ser modulada por el uso de antibióticos, agentes farmacéuticos, prebióticos, probióticos y la dieta [50,51].

La dieta ha sido identificada como el principal factor que influye en la composición de la microbiota intestinal observada en los obesos, inicialmente relacionada con un fenotipo obesogénico. Sin embargo, los cambios inducidos por la dieta en la microbiota intestinal parecen influir en el metabolismo energético del huésped [52], destacando la necesidad de controlar ambas variables [53]. Recientemente, se ha sugerido que la microbiota intestinal puede controlar la conducta alimentaria del huésped mediante diversos mecanismos potenciales. Los mecanismos propuestos incluyen alteraciones de los ejes microbioma-intestino-cerebro, producción de toxinas que pueden alterar el estado de ánimo con el objetivo de aumentar la ingesta de alimentos por parte del huésped, alteraciones de los receptores de diversa naturaleza con diferentes impactos en el comportamiento alimentario o influencias sobre la saciedad [47]. El efecto de la dieta sobre la composición de la microbiota intestinal es una vía muy estudiada [54], y se ha visto que los cambios de la comunidad bacteriana pueden producirse dentro de las 24h al cambiar el tipo de dieta [55, 56]. El componente de las grasas dentro de la dieta se ha asociado positivamente con *Bacteroides*, los carbohidratos actúan como sustrato para el crecimiento de *Prevotella* [56], y la fibra dietética proporciona una fuente de energía para *Bifidobacteria*, permitiéndole sobrevivir en el tránsito del tubo gastrointestinal y persistir en el huésped [57]. Aparte del efecto de la dieta sobre la composición de la microbiota, las bacterias pueden alterar el comportamiento alimentario y las preferencias alimentarias a través de diferentes mecanismos. Se ha propuesto recientemente una relación de retroalimentación positiva entre las preferencias dietéticas del huésped, el apetito y la microbiota intestinal [58]. La microbiota del intestino puede influir en el comportamiento del huésped a través del eje microbiota-intestino-cerebro [59], donde se ha visto que el nervio vago juega un papel clave en esta comunicación, regulando la conducta alimentaria y el peso corporal [60]. Las bacterias son capaces de producir péptidos análogos de hormonas de mamíferos y neuroquímicos implicados en el estado de ánimo y el

comportamiento, la saciedad y el hambre [61]. La respuesta de anticuerpos de los mamíferos contra los péptidos secretados por las bacterias es utilizada por estos para alterar indirectamente el apetito del huésped mediante la estimulación de la producción de autoanticuerpos [47]. Se están llevando a cabo nuevas investigaciones mediante análisis de funcionalidad, con el objetivo de investigar si el comportamiento alimentario afecta a la estructura de la microbiota intestinal y si esos cambios en la composición, pueden propagarse a las capacidades metabólicas de la comunidad bacteriana y el cerebro en relación con dicho comportamiento alimenticio.

## ***Suplementos alimenticios y microbiota intestinal***

### **▪ *Ácidos grasos y relevancia nutricional***

La capacidad de la microbiota intestinal para fermentar los polisacáridos no digeribles y los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), obteniendo acetato, propionato y butirato, proporcionan al epitelio intestinal y al hígado su principal fuente de energía. Además, estos SCFAs están implicados en la modulación de la respuesta inmune reduciendo la permeabilidad intestinal [62]. Se ha visto que el acetato promueve la activación de la lipogénesis y síntesis de colesterol. Esto, junto con el enriquecimiento en los genes microbianos implicados en el metabolismo de los carbohidratos podría promover la adiposidad y la obesidad [63]. Por otro lado, la reducción del nivel de butirato a través de la microbiota intestinal, contribuye al desarrollo de la resistencia a la insulina. Los individuos con T2DM presentan una menor proporción de *Clostridiales* productores de butirato (*Roseburia* y *Faecalibacterium prausnitzii*), y mayores proporciones de *Clostridiales* que no producen butirato [64]. Además, se piensa que *F. prausnitzii* y *Roseburia* spp protegen contra la translocación bacteriana (asociada a la mucosa) a través de su capacidad para producir butirato, y para reducir la inflamación adiposa que interviene en la resistencia a la insulina. Cabe destacar que el butirato tiene efectos directos sobre la regulación epigenética de la expresión génica, como un inhibidor de la histona deacetilasa, que influye en la susceptibilidad a la TDM2 [65].

En cuanto a los metabolitos de ácidos grasos altamente insaturados (*ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ácido linoleico o ácido  $\alpha$ -linolénico*), se ha visto que desempeñan un papel esencial en la función de la membrana celular, el desarrollo y la función del cerebro y del sistema nervioso, y en los procesos inflamatorios. También se ha demostrado que algunas cepas bacterianas aumentan la actividad de las desaturasas hepáticas en ratas, lo que da lugar a cantidades incrementadas de ácido araquidónico derivado del ácido linoleico [66]. Estudios recientes de Stanton *et al*, demostraron que las bacterias intestinales pueden convertir los ácidos linoleico y linolénico en isómeros bioactivos del ácido linoleico conjugado (CLA) y del ácido  $\alpha$ -linolénico conjugado [67]. Algunos autores ha publicado que los CLAs, al activar algunos receptores nucleares, podrían desempeñar papeles claves en la regulación del metabolismo, pero todavía hay enormes discrepancias entre los estudios en animales y humanos [68].

En particular, se ha demostrado recientemente que existe una relación bidireccional entre el DHA y la microbiota. El DHA puede alterar las poblaciones microbianas intestinales, y algunas especies microbianas como *Bifidobacterium* pueden mejorar la distribución tisular de DHA especialmente en el cerebro [69].

Recientes estudios indican que la microbiota intestinal puede influir mucho en muchos parámetros neurofisiológicos, incluyendo funciones cognitivas como el aprendizaje, la memoria y la toma de decisiones [70]. La microbiota intestinal se ha asociado con cambios en la expresión y liberación del péptido intestinal y en la expresión de los receptores de nutrientes, así como en los cambios en el SNC periférico. Los pacientes con enfermedades gastrointestinales, como la enfermedad inflamatoria intestinal, presentan una microbiota intestinal aberrante a veces asociada con trastornos psiquiátricos. En concordancia, se ha demostrado que el tratamiento con probióticos (con *Bifidobacterium longum* str. NCC3001) en ratones con colitis moderada altera el comportamiento cerebral, reduciendo el comportamiento ansioso [71]. Por otra parte, la administración de especies de *Bifidobacterium* junto con n-3 PUFAs en modelo animal resultó en mayores concentraciones de EPA en tejido hepático y DHA en tejido cerebral en comparación con las concentraciones alcanzadas sin administración bacteriana.

Por lo tanto, la microbiota intestinal es capaz de influir en las concentraciones de ácidos grasos en otros tejidos distintos del intestino [69].

#### ▪ **Probióticos**

La definición de probióticos del 2001 por la Organización Mundial de la Salud consistió en "*microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, otorgan un beneficio para la salud del individuo*" [72]. La influencia de los probióticos se ha vinculado con la reducción de tejido adiposo, hiperglucemia, hiperinsulinemia, colesterol y niveles de leptina, pero sólo en estudios de animales y adultos [73]. En niños, la influencia de los probióticos ha sido estudiada por la suplementación materna y/o temprana de lactantes. Las vías de sus funciones incluyen la modulación de la microbiota intestinal del lactante a través de la ingesta de leche materna o de la placenta y la reducción de los factores de riesgo (hiperglucemia, obesidad,...) en la madre [74]. Además, se ha demostrado que el uso de probióticos durante el embarazo reduce el riesgo de preeclampsia y de depresión posparto [75]. Los probióticos más comúnmente usados forman parte de la microbiota intestinal y son *Lactobacilli*, *Bifidobacterium* y *Enterococci* [76].

Varios estudios han demostrado cómo el uso de probióticos durante el embarazo evita diversos trastornos posnatales. Se han realizado varios estudios sobre la seguridad para el uso de probióticos durante el embarazo y la lactancia. Los estudios incluidos en un reciente metanálisis compararon *Lactobacillus* spp de forma individual o en combinación con *Bifidobacterium* spp frente a placebo; no se comprobó aumento en la incidencia de abortos espontáneos o malformaciones ni diferencias significativas en el peso al nacer, la edad gestacional o la incidencia de cesárea [77]. Sin embargo, un estudio reciente en madres embarazadas y lactantes de más de 13 meses de edad, mostró que la administración prenatal seguida de la administración postnatal de *Lactobacillus* de forma aislada y la combinación de *Lactobacillus* con *Bifidobacterium*, protegía contra la dermatitis atópica [78].

En cuanto a la influencia de los probióticos en el neurodesarrollo y desórdenes psiquiátricos, existe evidencia de que la administración de probióticos a ratones con síntomas parecidos al autismo mejora su comportamiento a medida que mejora su disbiosis. Sin embargo, no hay estudios similares en humanos, pero si se han propuesto ensayos clínicos en adultos y poblaciones infantiles [79]. A

pesar de los hallazgos, hasta la fecha, se han realizado pocos estudios en relación con el uso de probióticos durante el embarazo y las posibles influencias sobre la prevención de enfermedades en la descendencia, y no hay estudios directos que los relacionen con trastornos del desarrollo neurológico, por lo que futuros estudios en este campo están garantizados.

### ***Bibliografía***

1. Haslam DW, James WPT. Obesity. *The Lancet*, 366 (9492), 1197-1209. doi: 10.1016/s0140-6736(05)67483-1
2. O'Reilly JR, Reynolds RM. (2013). The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. *Clinical Endocrinology*, 78 (1), 9-16.
3. Torres-Espinola FJ, Berglund SK, Garcia-Valdes LM, Segura MT, Jerez A, Campos D, Moreno-Torres R, Rueda R, Catena A, Pérez-García M, Campoy C, (2015). Maternal Obesity, Overweight and Gestational Diabetes Affect the 1310 Offspring Neurodevelopment at 6 and 18 Months of Age - A Follow Up from the PREOBE Cohort. *PLoS One*, 10 (7), e0133010. doi: 10.1371/journal.pone.0133010.
4. Hollopeter G, Erickson J, Palmiter R. (1998). Role of neuropeptide Y in diet-, chemical-and genetic-induced obesity of mice. *International Journal of Obesity*, 22(6), 506-512.
5. Delzenne NM, Cani PD. (2011). Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 31, 15-31.
6. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JL. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut

- microbiome. *Cell Host Microbe*, 3 (4), 213-223. doi: 10.1016/j.chom.2008.02.015.
7. Borre YE, O’Keeffe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 20 (9), 509-518.
  8. Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. (2016). Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Frontiers in Microbiology*, 7.
  9. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Backhed H K, Gonazalez A, Werner JJ, Angenent LT, Knight R, Backhed F, Isolauri E, Salminen S, Ley R E. (2012). Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*, 150 (3), 470-480. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.008.
  10. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*, 6 (237), 237ra265. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599
  11. Wassenaar TM, Panigrahi P. (2014). Is a foetus developing in a sterile environment? *Letters in Applied Microbiology*, 59 (6), 572-579.
  12. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosh DW, Bieda J, Chaemsathong P, Miranda J, Chaiworapongsa T, Ravel J. (2014). The vaginal microbiota of pregnant women who subsequently have spontaneous preterm labor and delivery and those with a normal delivery at term. *Microbiome*, 2, 18. doi: 10.1186/2049-2618-2-18
  13. Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Mao L, Yu M, Xu J. (2015). The Placental Microbiome Varies in Association with Low Birth Weight in Full-Term Neonates. *Nutrients*, 7(8), 6924-6937. doi: 10.3390/nu7085315

14. Cerdó T, García-Valdés L, Altmäe S, Ruíz A, Suárez A, Campoy C. (2016). Role of microbiota function during early life on child's neurodevelopment. *Trends in Food Science & Technology*, 57, 273-288.
15. Di Renzo GC, Maulik D, Treadway A. (2014). Statement of retraction: Guarino A, Wudy A, Basile F, Ruberto E, Buccigrossi V." Composition and roles of intestinal microbiota in children". *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 27 (9), 973-973.
16. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, Piea A, Van den Brandt E, Stobberingh EE. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118 (2), 511-521.
17. Anderson A, Burggren A. (2014). Cognitive and neurodevelopmental benefits of extended formula-feeding in infants: Re: Deoni et al. 2013. *Neuroimage*, 100, 706-709.
18. Benoit B, Fauquant C, Daira P, Peretti N, Guichardant M, Michalski M-C. (2010). Phospholipid species and minor sterols in French human milks. *Food chemistry*, 120 (3), 684-691.
19. Timby N, Domellöf E, Hernell O, Lönnerdal B, Domellöf M. (2014). Neurodevelopment, nutrition, and growth until 12 mo of age in infants fed a low-energy, low-protein formula supplemented with bovine milk fat globule membranes: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99 (4), 860-868.
20. Liao Y, Alvarado R, Phinney B, Lönnerdal B. (2011). Proteomic characterization of human milk fat globule membrane proteins during a 12 month lactation period. *Journal of Proteome Research*, 10 (8), 3530-3541.

21. Timby N, Domellöf E, Hernell O, Lönnerdal B, Domellöf M. (2014). Neurodevelopment, nutrition, and growth until 12 mo of age in infants fed a low-energy, low-protein formula supplemented with bovine milk fat globule membranes: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99 (4), 860-868.
22. Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Aguilera M, Muñoz-Quezada S, Bermudez-Brito M, Peso-Echarri P, Martinez-Silla R, Vasallo-Morillas M, Campaña-Martin L, Vives-Piñera I, Ballesta-Martinez M, Gil A. (2013). Three main factors define changes in fecal microbiota associated with feeding modality in infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57(4), 461-466.
23. Gómez-Gallego C, Collado MC, Pérez G, Ilo T, Jaakkola U-M, Bernal MJ, Periago M, Frias R, Ros G, Salminen S. (2014). Resembling breast milk: influence of polyamine-supplemented formula on neonatal BALB/cOlaHsd mouse microbiota. *British Journal of Nutrition*, 111(06), 1050-1058.
24. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. *Clinical & Experimental Immunology*, 147 (2), 227-235.
25. Medzhitov R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
26. Kim DW, Young SL, Grattan DR, Jasoni CL. (2014). Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. *Biology of Reproduction*, 90(6), 130.
27. Gur TL, Shay L, Palkar AV, Fisher S, Varaljay VA, Dowd S, Bailey MT. (2016). Prenatal stress affects placental cytokines and neurotrophins, commensal microbes, and anxiety-like behavior in adult female offspring Abbreviated title: Prenatal stress and microbiome. *Brain, Behavior, and Immunity*.

28. Van der Burg JW, Sen S, Chomitz VR, Seidell JC, Leviton A, Dammann O. (2015). The role of systemic inflammation linking maternal BMI to neurodevelopment in children. *Pediatric research*.
29. Van Lieshout RJ. (2013). Role of maternal adiposity prior to and during pregnancy in cognitive and psychiatric problems in offspring. *Nutrition Reviews*, 71(suppl 1), S95-S101.
30. Bogacka I, Kurzynska A, Bogacki M, Chojnowska K. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptors in the regulation of female reproductive functions. *Folia Histochemica et Cytobiologica*.
31. Den Besten G, Gerding A, van Dijk TH, Ciapaite J, Bleeker A, van Eunen K, Havinga R, Groen A, Reijngoud D-J, Bakker BM. (2015). Protection against the Metabolic Syndrome by Guar Gum-Derived Short-Chain Fatty Acids Depends on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Glucagon-Like Peptide-1. *PloS One*, 10 (8), e0136364.
32. Bensinger SJ, Tontonoz P. (2008). Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*, 454 (7203), 470-477.
33. Lehrke M, Lazar MA. (2005). The many faces of PPAR $\gamma$ . *Cell*, 123 (6), 993-999.
34. Voltan S, Martines D, Elli M, Brun P, Longo S, Porzionato A, Macchi V, D'inta R, Scarpa M, Palu G, Sturniolo GC, Morelli L. (2008). *Lactobacillus crispatus* M247-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  in the intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 135(4), 1216-1227.
35. Specia S, Dubuquoy L, Desreumaux P. (2014). Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma in the Colon: Inflammation and Innate Antimicrobial Immunity. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48, S23-S27.

36. Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, Chamailard M, Desreumaux P. (2006). PPAR $\gamma$  as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut*, 55 (9), 1341-1349.
37. Yu Y-B, Li Y-Q. (2014). Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(32), 11273.
38. Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S. (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- $\gamma$  and RelA. *Nature Immunology*, 5(1), 104-112.
39. Yamamoto-Furusho J, Jacintez-Cazares M, Furuzawa-Carballeda J, Fonseca-Camarillo G. (2014). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors family is involved in the response to treatment and mild clinical course in patients with Ulcerative Colitis. *Disease Markers*, 2014.
40. Filiano AJ, Gadani SP, Kipnis J. (2014). Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Research*.
41. Berger J, Moller DE. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annual Review of Medicine*, 53(1), 409-435.
42. Heneka MT, Landreth GE. (2007). PPARs in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(8), 1031-1045.
43. Ke X, Xing B, Yu B, Yu X, Majnik A, Cohen S, Lane R, Joss-Moore L. (2014). IUGR disrupts the PPAR $\gamma$ -Setd8-H4K20me 1 and Wnt signaling pathways in the juvenile rat hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 38, 59-67.
44. Torres-Espínola FJ, Altmäe S, Segura MT, Jerez A, Anjos T, Chisaguano M, López-Sabater MC, Entrala C, Alvarez JC, Agil A. (2015). Maternal PPAR $\gamma$

Pro12Ala polymorphism is associated with infant's neurodevelopmental outcomes at 18 months of age. *Early Human Development*, 91(8), 457-462.

45. Heneka MT, Klockgether T, Feinstein DL. (2000). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Ligands Reduce Neuronal Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Cell Death *In Vivo*. *The Journal of Neuroscience*, 20(18), 6862-6867.
46. Kapadia R, Yi J-H, Vemuganti R. (2008). Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 13, 1813.
47. Alcock J, Maley CC, Aktipis CA. (2014). Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms. *Bioessays*, 36(10), 940-949. doi: 10.1002/bies.201400071
48. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schelegel ML, Tucker TA, Scherenzel MD, Knight R, Gordon JI. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320 (5883), 1647-1651.
49. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano R, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222-227.
50. Ferrer M, Ruiz A, Lanza F, Haange SB, Oberbach A, Till H, Bargiela R, Campoy C, Segura MT, Richter M, von Bergen M, Seifert J, Suarez A. (2013). Microbiota from the distal guts of lean and obese adolescents exhibit partial functional redundancy besides clear differences in community structure. *Environmental Microbiology*, 15(1), 211-226. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02845.x

51. Montoliu I, Genick U, Ledda M, Collino S, Martin FP, le Coutre J, Rezzi S. (2013). Current status on genome-metabolome-wide associations: an opportunity in nutrition research. *Genes & Nutrition*, 8(1), 19-27. doi: 10.1007/s12263-012-0313-7.
52. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, Krakoff J. (2011). Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 94(1), 58-65.
53. Sanz Y, Rastmanesh R, Agostoni C. (2013). Understanding the role of gut microbes and probiotics in obesity: how far are we? [Research Support, Non-U S Gov't]. *Pharmacol Res*, 69(1), 144-155.
54. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*, 69(1), 52-60.
55. Smith MI, Yatsunenkov T, Manary MJ, Trehan I, Mkakosya R, Cheng J, Kau AL, Rich SS, Concannon P, Mychaleckyj JC, Liu J, Houghton E, Li JV, Holmes EL, Nicholson J, Knights D, Ursell LKJ, Knight R, Gordon JI. (2013). Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science*, 339(6119), 548-554.
56. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105-108.
57. Bhattacharya T, Ghosh TS, Mande SS. (2015). Global Profiling of Carbohydrate Active Enzymes in Human Gut Microbiome. *PLoS One*, 10(11), e0142038 LID - 0142010.0141371/journal.pone.0142038 [doi].

58. Norris V, Molina F, Gewirtz AT. (2013). Hypothesis: bacteria control host appetites. [Review]. *J Bacteriol*, 195 (3), 411-416.
59. Bercik P, Collins SM, Verdu EF. (2012). Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterol Motil*, 24(5), 405-413. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01906.x
60. Camilleri M, Toouli J, Herrera MF, Kulseng B, Kow L, Pantoja JP, Marvik R, Johnsen G, Billington CJ, Moody FG, Knudson MB, Tweden KS, Vollmer M, Wilson RR, Anvari M. (2008). Intra-abdominal vagal blocking (VBLOC therapy): clinical results with a new implantable medical device. *Surgery*, 143(6), 723-731. doi: 10.1016/j.surg.2008.03.015
61. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. (2014). Minireview: Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol*, 28(8), 1221-1238. doi: 10.1210/me.2014-1108
62. Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, Santos RR, Cara DC, Cardoso VN, Correia MITD, Alvarez-Leite JI. (2012). Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-Fluorouracil administration. *Lipids*, 47 (7), 669-678.
63. Blaut M. (2014). Gut microbiota and energy balance: role in obesity. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 1-8.
64. Karlsson CL, Önnarfält J, Xu J, Molin G, Ahrné S, Thorngren-Jerneck K. (2012). The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity*, 20(11), 2257-2261.
65. Davie JR. (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2485S-2493S.

66. Wadhvani NS, Manglekar RR, Dangat KD, Kulkarni AV, Joshi SR. (2012). Effect of maternal micronutrients (folic acid, vitamin B 12) and omega 3 fatty acids on liver fatty acid desaturases and transport proteins in Wistar rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 86 (1), 21-27.
67. Wall R, Ross RP, Shanahan F, O'Mahony L, Kiely B, Quigley E, Dinan TG, Fitzgerald G, Stanton C. (2010). Impact of administered bifidobacterium on murine host fatty acid composition. *Lipids*, 45(5), 429-436.
68. Druart C, Dewulf EM, Cani PD, Neyrinck AM, Thissen J-P, Delzenne NM. (2014). Gut Microbial Metabolites of Polyunsaturated Fatty Acids Correlate with Specific Fecal Bacteria and Serum Markers of Metabolic Syndrome in Obese Women. *Lipids*, 49 (4), 397-402.
69. Tabbaa M, Golubic M, Roizen MF, Bernstein AM. (2013). Docosahexaenoic acid, inflammation, and bacterial dysbiosis in relation to periodontal disease, inflammatory bowel disease, and the metabolic syndrome. *Nutrients*, 5 (8), 3299-3310.
70. Montiel-Castro AJ, González-Cervantes RM, Bravo-Ruiseco G, Pacheco-López G. (2013). The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7.
71. Collins SM, Surette M, Bercik P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10 (11), 735-742.
72. Hotel A, Córdoba A. (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. *PREVENTION*, 5(1).
73. Vitetta L. (2011). Probiotics: An update. Paper presented at the International Conference on the Science of Nutrition in Medicine and Healthcare.

74. Balasubramanian H, Patole S. (2015). Early probiotics to prevent childhood metabolic syndrome: A systematic review. *World Journal of Methodology*, 5(3), 157.
75. Borre YE, Moloney RD, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. (2014). The impact of microbiota on brain and behavior: mechanisms & therapeutic potential *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease* (pp. 373-403): Springer.
76. Nole KLB, Yim E, Keri JE. (2014). Probiotics and prebiotics in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(4), 814-821.
77. Elias J, Bozzo P, Einarson A. (2011). Are probiotics safe for use during pregnancy and lactation? *Canadian Family Physician*, 57(3), 299-301.
78. Panduru M, Panduru N, Sălăvăstru C, Tiplica GS. (2015). Probiotics and primary prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled studies. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 29 (2), 232-242.
79. Gilbert JA, Krajmalnik-Brown R, Porazinska DL, Weiss SJ, Knight R. (2013). Toward effective probiotics for autism and other neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155 (7), 1446-1448. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.035



## CAPÍTULO 9

### **Influencia del estado metabólico materno sobre el comportamiento de los hijos a los 3.5 años de edad**

Nieto-Ruiz A, Torres-Espínola FJ, Arias M, López-Torrecillas F, Campoy C

#### **Resumen**

**Introducción:** La obesidad materna y la diabetes gestacional pueden tener importantes consecuencias a nivel obstétrico y producir efectos a largo plazo sobre la salud de los hijos. El objetivo de este estudio fue investigar la relación entre el estado metabólico materno y el desarrollo del comportamiento a los 3.5 años en niños nacidos de madres obesas y/o con diabetes gestacional.

**Métodos:** De un total de 331 mujeres embarazadas incluidas en el proyecto PREOBE, 133 mujeres y sus hijos fueron analizados en el presente estudio. Las madres gestantes fueron distribuidas en cuatro grupos según su índice de masa corporal pre-gestacional y el desarrollo de diabetes gestacional: Sobrepeso (n=23), obesidad (n=20), diabetes gestacional (n=40) y normopeso como grupo control (n=50). Las madres clasificaron los problemas de conducta de sus hijos mediante el cuestionario *Child Behavior Checklist* (CBCL) cuando éstos tenían 3.5 años de edad. La normalidad de las variables se estudió mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y la comparación de las puntuaciones obtenidas mediante el CBCL entre grupos de estudio, se realizó mediante los

tests ANOVA, MANOVA y Chi-Cuadrado; para realizar dichos análisis se ha utilizado el paquete estadístico SPSS vs 22.0.

**Resultados:** Se han comprobado diferencias significativas entre los grupos de estudio en *problemas de ansiedad* ( $p=0.032$ ) y en el *total de problemas de conducta* ( $p=0.036$ ); el análisis reveló que las puntuaciones más altas correspondieron a los niños nacidos de madres obesas/sobrepeso respecto a los nacidos de madre normo-peso. Además, los hijos nacidos de madres con diabetes gestacional mostraron a los 3.5 años, puntuaciones significativamente más altas en *comportamiento agresivo* ( $p=0.038$ ) y en *problemas de internalización* ( $p=0.026$ ) frente a los niños nacidos de madres normo-peso.

**Conclusiones:** Los resultados encontrados concuerdan con otras investigaciones y confirman la hipótesis de que el estado metabólico materno puede influir sobre el desarrollo del comportamiento de los hijos. La obesidad y el sobrepeso durante el embarazo y la diabetes gestacional se asocian con más problemas conductuales en los hijos a los 3.5 años de edad. Estos resultados podrían justificarse por el ambiente materno patológico en el caso de obesidad/sobrepeso y/o diabetes gestacional, donde se mantienen procesos inflamatorios de distinto grado y alteraciones metabólicas que podrían estar implicadas en el desarrollo de problemas psico-conductuales del niño, tal y como se ha observado en el presente estudio

## ***Introducción***

La obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial y se ha duplicado en todo el mundo desde 1980. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2014, más de 1,9 millones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso, de los cuales 600 millones eran obesos y 42 millones de niños menores de 5 años tenían sobrepeso u obesidad en el año 2013 [1]. En España, el índice de obesidad en la población adulta es del 14,5% mientras que el sobrepeso asciende al 38,5% [2]; en la población infantil y juvenil las cifras son alarmantes, ya que el 13,9% padece obesidad y el 26,3% sobrepeso [3].

La obesidad materna está entre las complicaciones más comunes del embarazo en el mundo desarrollado, afectando hasta el 40% de las mujeres y asociándose a consecuencias graves como aborto involuntario, diabetes gestacional, trombo-embolismo, pre-eclampsia, parto disfuncional y hemorragia post-parto entre otras. Además, estos efectos también se extienden al feto, neonato y al niño, aumentando el riesgo de padecer anomalías congénitas fetales, defectos del tubo neural, muerte fetal, muerte neonatal, macrosomía, prematuridad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y obesidad infantil [4].

La diabetes gestacional se estima que afecta hasta el 14% de los embarazos. Se asocia a una mayor tasa de parto instrumental y cesárea, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, obesidad y morbilidad cardiovascular. Las implicaciones para el feto y el neonato son muerte fetal precoz, muerte neonatal, anomalías congénitas, macrosomía y complicaciones metabólicas [5].

Más allá de estas consecuencias, la obesidad y/o la diabetes maternas pueden "programar la salud" de la descendencia y condicionar en los hijos un aumento del riesgo de obesidad y trastornos metabólicos asociados. Barker estableció la teoría de la Programación Metabólica al relacionar el bajo peso al nacimiento junto a una rápida ganancia ponderal postnatal, con un alto riesgo de padecer enfermedades coronarias, hipertensión, resistencia a la insulina y diabetes en la edad adulta [6]. Es importante por tanto, conocer qué cambios estructurales y funcionales se producen en los órganos fetales según el estado metabólico materno, y así determinar la vulnerabilidad del feto y del recién nacido.

La exposición del feto a un ambiente intrauterino adverso, como el que se produce en la obesidad materna y/o diabetes gestacional, aumenta el riesgo de desarrollar diferentes trastornos del neurodesarrollo, como por ejemplo problemas de atención, hiperactividad y ansiedad [7,8]. Existe evidencia científica que demuestra que la obesidad materna y/o diabetes gestacional pueden condicionar el desarrollo de la función cerebral de los hijos, determinando alteraciones en el desarrollo de la función cognitiva. Tanda et al. [9] encontraron una asociación entre la obesidad materna pre-gestacional y un menor coeficiente intelectual (IQ) en los hijos. Por otro lado, hijos nacidos de madres diabéticas presentaron una alteración del desarrollo psicomotor [10], un puntaje más bajo en desarrollo global y en el IQ respecto a los niños nacidos de madres normo-peso [11]. Sin embargo, los estudios que examinen los efectos del peso materno o de la diabetes gestacional sobre el desarrollo de problemas psico-conductuales en el niño, son escasos y con resultados contradictorios o poco consistentes. Los estudios realizados en cohortes nórdicas han demostrado que los niños nacidos de mujeres obesas tienen mayor riesgo de presentar síntomas de trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) [12] y alteraciones de la regulación emocional [13], que aquellos nacidos de madres con peso normal [12]. No obstante, Brion et al. [14] no encontraron asociaciones consistentes entre el sobrepeso y la obesidad antes del embarazo y problemas de comportamiento en edad escolar.

El objetivo de nuestro estudio ha sido evaluar la influencia del índice de masa corporal materno y la existencia de diabetes gestacional sobre el comportamiento del niño a los 3.5 años de edad.

## ***Métodos***

### **Diseño del estudio**

El presente estudio se ha llevado a cabo en el marco del Proyecto de Excelencia PREOBE ([www.proyectopreobe.com](http://www.proyectopreobe.com)), (Junta de Andalucía, ref. nº P06-CTS-02341), llevado a cabo entre 2008 y 2012, en los Hospitales Universitarios San Cecilio y Materno-Infantil de Granada con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

*Criterios de Inclusión*

- Grupo I: Embarazadas con diabetes gestacional.
- Grupo II: Embarazadas con sobrepeso pre-concepcional ( $25 \geq \text{IMC} < 30$ ).
- Grupo III: Mujeres gestantes con obesidad pre-concepcional ( $\text{IMC} \geq 30$ ).
- Grupo IV: Embarazadas sanas y normopeso ( $18.5 \geq \text{IMC} < 25$ ).
- Edad materna entre 18 y 45 años.
- Embarazos simples y no complicados.

*Criterios de Exclusión*

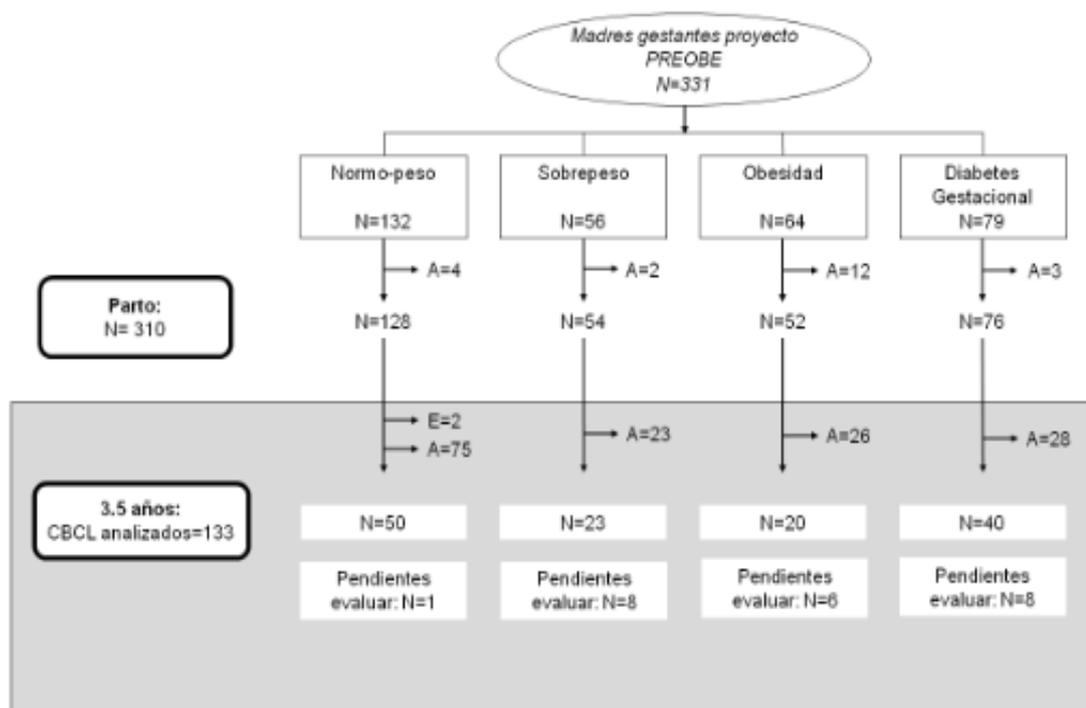
- Embarazadas que estuvieran participando en otro estudio de investigación.
- Embarazadas que recibieran cualquier tipo de tratamiento farmacológico.
- Embarazadas con cualquier otra enfermedad distinta a las incluidas en los criterios de inclusión, tales como hipertensión, pre-eclampsia, infección durante la gestación, hipotiroidismo, hipertiroidismo, enfermedades hepáticas o renales, malnutrición materna o crecimiento intrauterino retardado.
- Embarazadas con dieta extravagante o dieta vegana.

El diagnóstico de diabetes gestacional fue realizado por los facultativos del hospital correspondiente y se basó en una prueba oral de tolerancia a la glucosa, interpretada de acuerdo con los criterios del Grupo Nacional de Datos de Diabetes [15] y la III Conferencia Internacional sobre Diabetes Mellitus Gestacional [16]. Las madres con diabetes gestacional fueron incluidas en el protocolo seguido en los Servicios de Endocrinología y Nutrición de ambos Hospitales, donde fueron tratadas con antidiabéticos orales o terapia de insulina, dependiendo de su necesidad, y siguieron recomendaciones dietéticas específicas. Esta intervención no fue parte del presente estudio. Las madres del grupo con sobrepeso y obesidad que no desarrollaron diabetes gestacional no recibieron ninguna intervención, excepto las recomendaciones dietéticas habituales.

Se obtuvo la aprobación del estudio por parte del Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Granada y de los comités de Bioética para la investigación clínica de los Hospitales Universitario San Cecilio y Materno-Infantil

de Granada. Al inicio del estudio, y antes de su inclusión en el proyecto, se obtuvo la firma del consentimiento informado de cada una de las participantes.

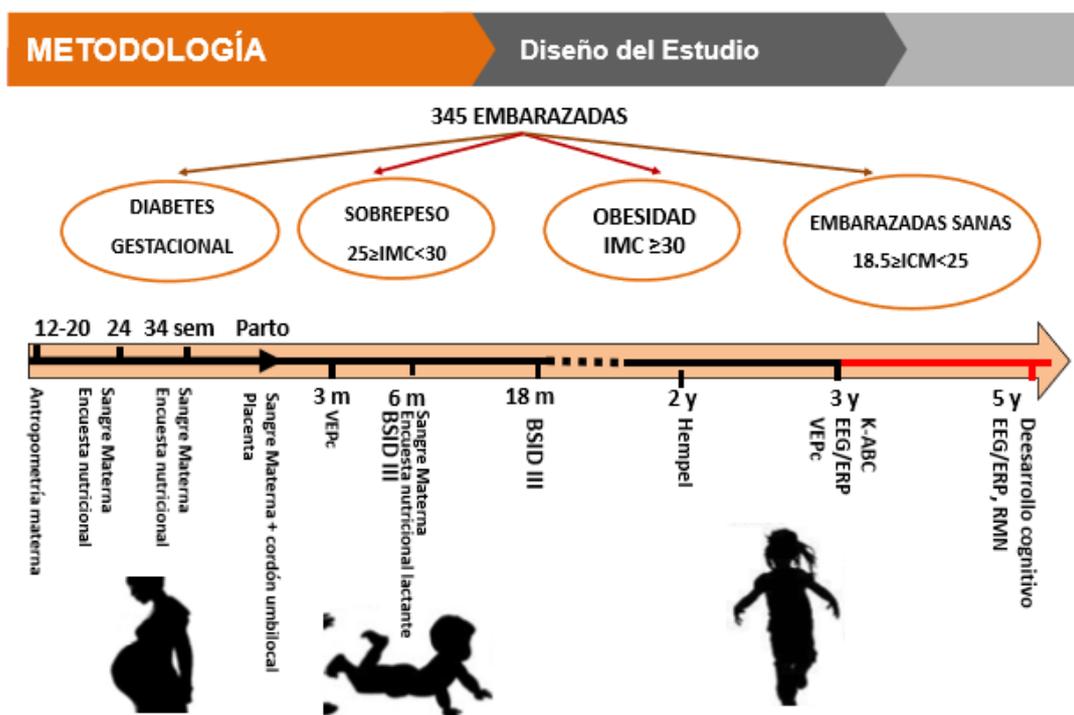
El proyecto PREOBE se trata de un estudio observacional longitudinal para analizar el efecto a medio-largo plazo de la obesidad y la diabetes materna durante la gestación sobre el desarrollo de los hijos. En la figura 1 se describe la muestra de estudio utilizada para este análisis; se reclutaron un total de 345 embarazadas entre las 12 y 20 semanas de gestación, de las cuales 331 continuaron en el estudio hasta el momento del parto. Las gestantes se distribuyeron en cuatro grupos dependiendo del IMC previo al embarazo y el desarrollo de diabetes gestacional: Peso normal (n=50), Sobrepeso (n=23), Obesidad (n=20), Diabetes gestacional (n=40).



**Figura 1:** La figura muestra los abandonos desde el parto hasta los 3.5 años de edad de los niños. A=abandonos y E=exclusiones (1 lactante en el parto debido a una cardiopatía congénita y otro antes de los 6 meses de seguimiento debido a una inmunodeficiencia severa).

Se han realizado controles a las madres en las semanas 20, 24, 34 de gestación, en el momento del parto, al 6º mes postparto y al año. Tras el nacimiento los niños han sido supervisados en los 3 primeros días de vida, a los 3,

6, 9, 12, 18 meses, a los 2 años y a los 3.5 años (Figura 2). Se llevaron a cabo encuestas socioeconómicas, médicas, de hábitos de vida (incluyendo actividad física), nutricionales tanto a la madre durante la gestación como a su hijo durante los primeros 3.5 años de vida; además, se realizaron antropometría y estudio de la composición corporal (bioimpedancia) maternos y en sus hijos evaluación del crecimiento, neurodesarrollo y desarrollo de la conducta hasta los 3.5 años de edad. En el presente estudio, se han analizado los datos obtenidos del cuestionario de comportamiento *Child Behavior Checklist* (CBCL) a los 3.5 años de edad y para su análisis se han tenido en cuenta diferentes factores confusores tales como la edad materna, IQ materno, nivel educativo, tipo de trabajo, nivel socioeconómico, tipo de parto, número de hijos, peso al nacimiento o tipo de alimentación postnatal.



**Figura 2.** Esquema del estudio evolutivo realizado en madres e hijos participantes en el estudio PREOBE.

## **Evaluación del comportamiento**

El Child Behavior Checklist (CBCL) es un instrumento de evaluación neuropsicológica del desarrollo del comportamiento internacionalmente reconocido, mediante el cual los padres o cuidadores del niño asignan una puntuación acerca de los problemas de conducta del mismo, además de las competencias adquiridas. El CBCL también puede ser usado con el fin de medir los cambios comportamentales y emocionales del niño a lo largo del tiempo. Para este estudio, se utilizó la versión CBCL 1½-5, que se compone de 101 elementos divididos en dos escalas y una global [17]. La escala de problemas de internalización está compuesta por cuatro síndromes: Emocionalidad reactiva, ansiedad/depresión, quejas somáticas (somatización) e introversión. La escala de problemas de externalización está compuesta por dos síndromes: Problemas de atención y comportamiento agresivo. Además, mediante este test se evalúan problemas de sueño, afectivos, de ansiedad, generales del desarrollo, déficit de atención e hiperactividad (TDAH) y de oposición desafiante, basados en los criterios diagnósticos del DSM IV (Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales). La escala de problemas totales, engloba todos los items evaluados. Las puntuaciones en cada escala se dividieron en tres variables: *normal*, *límite* y *clínica* (patológica). En el presente estudio, hemos utilizado la versión española validada y los valores de corte alemanes, que son similares a los españoles.

## **Análisis estadístico**

A los 3.5 años de seguimiento se ha realizado un análisis estadístico de los resultados comportamentales obtenidos hasta el momento. Para ello, se ha utilizado el paquete de programas estadísticos SPSS vs 22.00.

Se obtuvo un primer análisis descriptivo para toda la muestra, calculando la media, mediana, desviación típica (SD), mínimos, máximos, así como el error estándar de la media [en las tablas se muestran la media (X), desviación típica (SD) y tamaño muestral por cada grupo (n)].

Se ha contrastado la normalidad de las variables cuantitativas mediante el test de Shapiro-Wilk, y en el caso de no normalidad se aplicaron métodos no

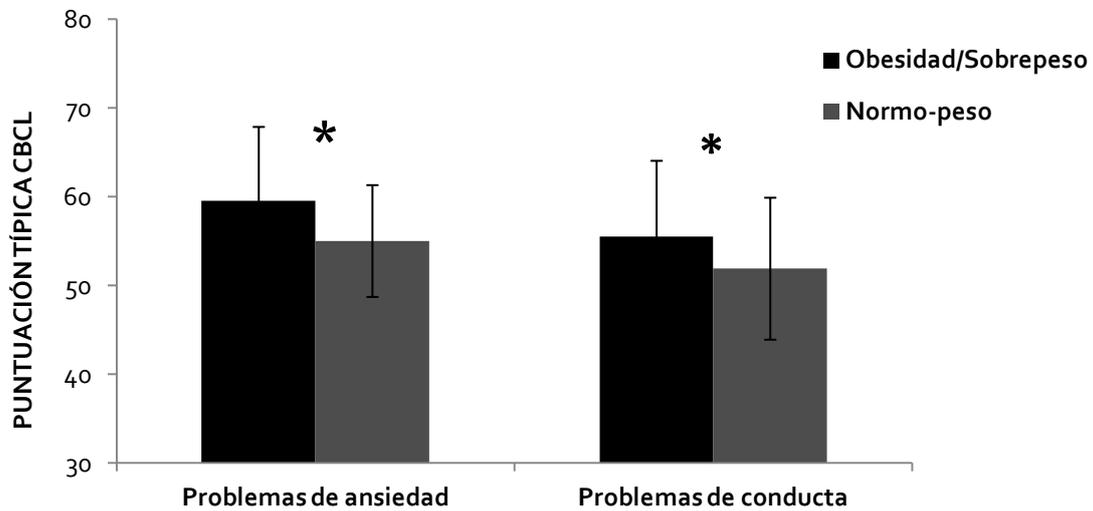
paramétricos. Para la comparación de las puntuaciones del CBCL según los grupos de estudio se utilizaron los métodos de ANOVA y Kruskal-Wallis (no paramétrica) y un Modelo Lineal General Multivariante (MANOVA). Una vez determinadas las diferencias estadísticamente significativas se procedió a realizar una comparación por pares (post hoc) usando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Para estudiar la asociación de variables categóricas se ha utilizado el test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o test exacto de Fisher. En todos los casos se estableció el nivel de significancia cuando  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

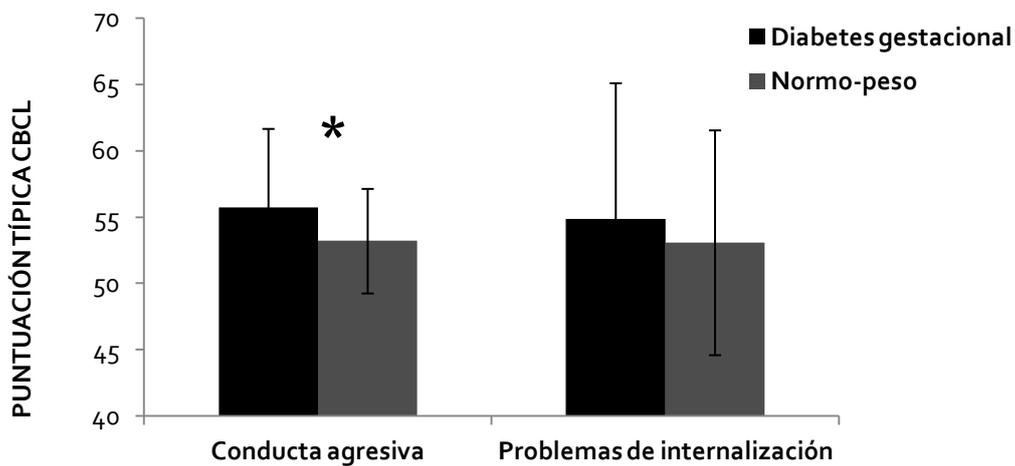
De un total de 331 mujeres embarazadas incluidas en el proyecto PREOBE, 133 madres y sus hijos fueron incluidos en el presente estudio, como análisis preliminar.

El análisis de las puntuaciones obtenidas en el CBCL según los diferentes grupos de estudio reveló diferencias significativas a favor de los niños nacidos de madres normo-peso (Tabla 1). En *problemas de internalización* ( $p=0.026$ ), los hijos de madres con diabetes gestacional presentaron un mayor porcentaje de patología clínica que los niños de madres con obesidad y normo-peso, pero estas diferencias desaparecen al realizar la comparación post hoc mediante el método de corrección de Bonferroni. En la *puntuación total de problemas de conducta* ( $p=0.036$ ) encontramos que los hijos nacidos de madres con sobrepeso presentan mayor porcentaje de patología clínica que los nacidos de madres sanas normo-peso; los hijos de madres diabéticas o con obesidad no difieren de forma significativa de ningún grupo. Para realizar un análisis secundario, y tras descartar que no había diferencias entre los grupos de obesidad y sobrepeso, se unificaron los grupos de estudio de la siguiente forma: Normo-peso ( $n=50$ ), Sobrepeso/Obesidad ( $n=43$ ) y Diabetes gestacional ( $n=40$ ) (Tabla 2). Encontramos que los hijos nacidos de madres obesas/sobrepeso presentaron puntuaciones más altas en *problemas de ansiedad* ( $p=0.032$ ) comparados con los niños nacidos de madres sanas normo-peso; los hijos de madres diabéticas gestacionales no difieren de ninguno de los dos grupos. Además los hijos nacidos de madres con diabetes gestacional

mostraron puntuaciones significativamente más altas en *comportamiento agresivo* ( $p=0.038$ ) respecto a los niños nacidos de madres sanas normo-peso; sin embargo, los hijos de madres con sobrepeso/obesidad no difieren de ninguno de los dos grupos (Figuras 3 y 4).



**Figura 3.** Representación de las diferencias significativas encontradas en las puntuaciones de los ítems del test CBCL tras la comparación entre niños nacidos de madres obesas/sobrepeso frente a aquellos nacidos de madres sanas normo-peso.



**Figura 4.** Representación de las diferencias significativas encontradas en las puntuaciones de los ítems del test CBCL tras la comparación entre niños nacidos de madres con diabetes gestacional frente a aquellos nacidos de madres sanas normo-peso.

**Tabla 1.** Efecto del estado metabólico materno (obesidad, sobrepeso y diabetes gestacional) en la puntuación del CBCL de sus hijos a los 3.5 años de edad, comparado con hijos nacidos de mujeres normo-peso (grupo control).

		<b>Normo-peso (n=50)</b>	<b>Sobrepeso (n=23)</b>	<b>Obesidad (n=20)</b>	<b>Diabetes gestacional (n=40)</b>	<b>p</b>
Emocionalidad Reactiva	Normal	95,92% <sup>a</sup>	81,82% <sup>a</sup>	85,00% <sup>a</sup>	92,31% <sup>a</sup>	0.179
	Borderline	4,08% <sup>a</sup>	18,18% <sup>a</sup>	15,00% <sup>a</sup>	7,69% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	
Ansiedad/ Depresión	Normal	86,00% <sup>a</sup>	78,26% <sup>a</sup>	80,00% <sup>a</sup>	80,00% <sup>a</sup>	0.775
	Borderline	10,00% <sup>a</sup>	13,04% <sup>a</sup>	20,00% <sup>a</sup>	12,50% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	4,00% <sup>a</sup>	8,70% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	7,50% <sup>a</sup>	
Quejas Somáticas	Normal	96,00% <sup>a</sup>	82,61% <sup>a</sup>	90,00% <sup>a</sup>	92,50% <sup>a</sup>	0.067
	Borderline	0,00% <sup>a</sup>	4,35% <sup>a</sup>	10,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	4,00% <sup>a</sup>	13,04% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	7,50% <sup>a</sup>	
Introversión	Normal	88,00% <sup>a</sup>	78,26% <sup>a</sup>	100,00% <sup>a</sup>	95,00% <sup>a</sup>	0.179
	Borderline	2,00% <sup>a</sup>	4,35% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	2,50% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	10,00% <sup>a</sup>	17,39% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	2,50% <sup>a</sup>	

Problemas de Sueño	Normal	90,00% <sup>a</sup>	95,65% <sup>a</sup>	100,00% <sup>a</sup>	95,00% <sup>a</sup>	0.877
	Borderline	8,00% <sup>a</sup>	4,35% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	5,00% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	2,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	
Problemas de Atención	Normal	98,00% <sup>a</sup>	95,65% <sup>a</sup>	100,00% <sup>a</sup>	90,00% <sup>a</sup>	0.283
	Borderline	2,00% <sup>a</sup>	4,35% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	10,00% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	
Conducta Agresiva	Normal	78,00% <sup>a</sup>	56,52% <sup>a</sup>	65,00% <sup>a</sup>	65,00% <sup>a</sup>	0.214
	Borderline	8,00% <sup>a</sup>	17,39% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	10,00% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	14,00% <sup>a</sup>	26,09% <sup>a</sup>	35,00% <sup>a</sup>	25,00% <sup>a</sup>	
Problemas de Internalización	Normal	92,00% <sup>a</sup>	86,96% <sup>a</sup>	80,00% <sup>a</sup>	80,00% <sup>a</sup>	<b>0.026</b>
	Borderline	4,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	20,00% <sup>a</sup>	5,00% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	4,00% <sup>a</sup>	13,04% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	15,00% <sup>a</sup>	
Problemas de Externalización	Normal	86,00% <sup>a</sup>	60,87% <sup>a</sup>	60,00% <sup>a</sup>	67,50% <sup>a</sup>	0.109
	Borderline	6,00% <sup>a</sup>	8,70% <sup>a</sup>	10,00% <sup>a</sup>	10,00% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	8,00% <sup>a</sup>	30,43% <sup>a</sup>	30,00% <sup>a</sup>	22,50% <sup>a</sup>	

Problemas Totales	Normal	90,00% <sup>a</sup>	73,91% <sup>a</sup>	95,00% <sup>a</sup>	92,50% <sup>a</sup>	<b>0.036</b>
	Borderline	8,00% <sup>a</sup>	4,35% <sup>a</sup>	5,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	2,00% <sup>a</sup>	21,74% <sup>b</sup>	0,00% <sup>a,b</sup>	7,50% <sup>a,b</sup>	
Problemas Afectivos	Normal	94,00% <sup>a</sup>	78,26% <sup>a,b</sup>	70,00% <sup>b</sup>	80,00% <sup>a,b</sup>	0.064
	Borderline	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	5,00% <sup>a</sup>	5,00% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	6,00% <sup>a</sup>	21,74% <sup>a</sup>	25,00% <sup>a</sup>	15,00% <sup>a</sup>	
Problemas de Ansiedad	Normal	86,00% <sup>a</sup>	73,91% <sup>a</sup>	90,00% <sup>a</sup>	77,50% <sup>a</sup>	0.261
	Borderline	6,00% <sup>a</sup>	13,04% <sup>a</sup>	5,00% <sup>a</sup>	20,00% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	8,00% <sup>a</sup>	13,04% <sup>a</sup>	5,00% <sup>a</sup>	2,50% <sup>a</sup>	
Problemas Generales del Desarrollo	Normal	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	0.637
	Borderline	98,00% <sup>a</sup>	95,65% <sup>a</sup>	100,00% <sup>a</sup>	100,00% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	2,00% <sup>a</sup>	4,35% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	
Problemas Déficit Atención e Hiperactividad	Normal	100,00% <sup>a</sup>	95,65% <sup>a</sup>	95,00% <sup>a</sup>	90,00% <sup>a</sup>	0.181
	Borderline	0,00% <sup>a</sup>	4,35% <sup>a</sup>	5,00% <sup>a</sup>	7,50% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	2,50% <sup>a</sup>	

Problemas de Oposición Desafiante	Normal	92,00% <sup>a</sup>	78,26% <sup>a</sup>	80,00% <sup>a</sup>	80,00% <sup>a</sup>	0.182
	Borderline	8,00% <sup>a</sup>	21,74% <sup>a</sup>	15,00% <sup>a</sup>	20,00% <sup>a</sup>	
	Patología Clínica	0,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	5,00% <sup>a</sup>	0,00% <sup>a</sup>	

---

Los datos son porcentajes

P = Test de Chi Cuadrado. Valores que no comparten el mismo sufijo (abc) son significativamente diferentes en la comparación por pares (post hoc) usando la corrección de Bonferroni.

**Tabla 2.** Efecto de la obesidad/sobrepeso durante el embarazo o la diabetes gestacional en el desarrollo comportamental de sus hijos a los 3.5 años de edad, comparado con hijos nacidos de mujeres normo-peso (grupo control).

CBCL Scores at 3.5 years	Normo-peso (n=50)	Sobrepeso/Obesidad (n=43)	Diabetes gestacional (n=40)	p
Emocionalidad Reactiva	54.08±5.42 <sup>a</sup>	57.00 ± 6.87 <sup>a</sup>	57.00± 6.55 <sup>a</sup>	0.089
Ansiedad/Depresión	54.66± 5.12 <sup>a</sup>	57.49 ± 6.83 <sup>a</sup>	55.85 ± 6.75 <sup>a</sup>	0.095
Quejas Somáticas	55.92 ± 6.92 <sup>a</sup>	57.00 ± 7.60 <sup>a</sup>	57.28 ± 6.83 <sup>a</sup>	0.627
Introversión	56.34 ± 6.38 <sup>a</sup>	57.35 ± 6.60 <sup>a</sup>	56.35 ± 6.64 <sup>a</sup>	0.709
Problemas de Sueño	56.28 ± 8.55 <sup>a</sup>	57.53 ± 7.30 <sup>a</sup>	54.80 ± 5.81 <sup>a</sup>	0.247
Problemas de Atención	54.16 ± 5.60 <sup>a</sup>	55.93 ± 4.70 <sup>a</sup>	54.03 ± 4.75 <sup>a</sup>	0.673
Conducta Agresiva	53.20 ± 3.94 <sup>a</sup>	54.28 ±4.52 <sup>a,b</sup>	55.72±5.93 <sup>b</sup>	<b>0.038</b>
Problemas de Internalización	53.08 ± 8.47 <sup>a</sup>	56.14 ±10.15 <sup>a</sup>	54.87±10.22 <sup>a</sup>	0.304

Problemas de Externalización	50.04 ± 7.50 <sup>a</sup>	52.56 ± 6.86 <sup>a</sup>	53.03 ± 8.56 <sup>a</sup>	0.133
Problemas Totales	51.92 ± 8.00 <sup>a</sup>	55.77 ± 8.82 <sup>a</sup>	54.45 ± 9.12 <sup>a</sup>	0.094
Problemas Afectivos	55.56 ± 6.03 <sup>a</sup>	58.33 ± 7.40 <sup>a</sup>	56.28 ± 5.88 <sup>a</sup>	0.112
Problemas de Ansiedad	55.04 ± 6.30 <sup>a</sup>	59.23 ± 8.88 <sup>b</sup>	56.67 ± 8.21 <sup>a,b</sup>	<b>0.032</b>
Problemas Generales del Desarrollo	56.52 ± 6.62 <sup>a</sup>	57.95 ± 7.30 <sup>a</sup>	56.55 ± 6.62 <sup>a</sup>	0.536
Problemas Déficit Atención e Hiperactividad	53.62 ± 5.12 <sup>a</sup>	54.84 ± 4.90 <sup>a</sup>	54.60 ± 5.17 <sup>a</sup>	0.469
Problemas de Oposición Desafiante	53.40 ± 4.01 <sup>a</sup>	54.16 ± 4.83 <sup>a</sup>	55.85 ± 6.78 <sup>a</sup>	0.087

---

Los datos son media (X) ± desviación típica (SD)

P = Análisis Multivariante de la Varianza (MANOVA). Valores que no comparten el mismo sufijo (abc) son significativamente diferentes en la comparación por pares (post hoc) usando la corrección de Bonferroni.

## ***Discusión***

En el presente estudio hemos explorado la relación entre sobrepeso, obesidad y/o diabetes gestacional durante el embarazo y el riesgo de los hijos de desarrollar problemas de conducta a los 3.5 años. Los resultados encontrados muestran que los hijos nacidos de madres obesas, con sobrepeso y con diabetes gestacional presentan mayores niveles de problemas conductuales que los nacidos de madres sanas normo-peso.

Estos hallazgos se podrían justificar si se tiene en cuenta que en los embarazos de madres obesas/sobrepeso y/o con diabetes gestacional, el desarrollo fetal se produce en un entorno metabólicamente adverso, con un status inflamatorio continuado durante la gestación, lo que podría estar implicado en la etiología de determinados trastornos neuro-conductuales en la infancia.

En anteriores publicaciones de este estudio, se observó que los hijos de madres obesas mostraban a los 6 meses de edad un desarrollo cognitivo y del lenguaje superior respecto a aquellos nacidos de madres con sobrepeso, diabetes gestacional y sanas normopeso. Este efecto, aparentemente positivo, de la obesidad materna no solo desaparecía a los 18 meses de edad, sino que los hijos nacidos de estas embarazadas mostraban un enlentecimiento en el neurodesarrollo entre los 6 y los 18 meses de edad respecto a los demás grupos de estudio [18].

Los resultados del presente estudio son similares a los de otras investigaciones empíricas, donde se ha relacionado la diabetes gestacional con un menor IQ, problemas de lenguaje, de atención, de conducta e impulsividad en los hijos [19]. Heejoo Jo, et al. 2015, en una investigación sobre la relación entre el IMC pre-concepcional y el desarrollo psicosocial en la infancia, determinaron que los niños cuyas madres eran severamente obesas antes del embarazo tenían un mayor riesgo de padecer problemas emocionales, TDAH, autismo o retraso del desarrollo [20]. Los resultados obtenidos en el presente análisis corroboran las hipótesis establecidas por Torres-Espínola FJ et al., donde se sugería un efecto precoz aparentemente beneficioso de la obesidad materna que al desaparecer a los 18

meses sugerían la probabilidad de efectos negativos a largo plazo, como se ha podido observar a los 3.5 años [18].

Nuestros resultados pretenden aumentar el interés sobre el estudio de la influencia de la obesidad y el sobrepeso materno y la diabetes gestacional en el desarrollo del comportamiento y del sistema nervioso central de los hijos; de este modo se conseguirá avanzar en el conocimiento acerca de los efectos negativos que pueden provocar las alteraciones metabólicas maternas en las diferentes etapas del desarrollo de los hijos. Esto es de gran importancia, ya que actualmente no existen muchas investigaciones dedicadas específicamente al desarrollo de la conducta, especialmente con madres obesas o en aquellas que desarrollan diabetes gestacional.

La nutrición es el factor ambiental más importante que va a influir en el neurodesarrollo durante las etapas prenatal y neonatal [21], por tanto, las deficiencias nutricionales asociadas a la obesidad materna y diabetes gestacional van a repercutir en el desarrollo cerebral del feto, condicionando el desempeño ejecutivo durante la maduración, el desarrollo cognitivo y la salud mental durante la infancia. Actualmente no se conocen con exactitud los mecanismos implicados entre estas asociaciones, por lo que se necesitan más estudios sobre factores ambientales y genéticos específicos que identifiquen los verdaderos factores de riesgo asociados al desarrollo de enfermedades mentales y de la conducta; solo de este modo se podrá contribuir a determinar el impacto específico de cada uno de ellos y a comprender las diferencias individuales durante la infancia, lo que ayudará a promover programas de intervención específicos destinados a mejorar el desarrollo integral del niño.

## ***Conclusiones***

- Tanto la obesidad/sobrepeso como la diabetes gestacional maternas se asocian a un mayor riesgo de desarrollo de problemas comportamentales en los hijos a los 3.5 años de edad.

▪ El control nutricional y metabólico de las embarazadas obesas es necesario y se debe establecer desde el inicio de la gestación para evitar las consecuencias a largo plazo sobre el desarrollo de la conducta de sus hijos.

▪ El control de la diabetes gestacional establecido en los Hospitales de Granada se muestra insuficiente para evitar los problemas conductuales observados en los hijos a los 3.5 años de vida. Es necesario realizar un estudio serio de los protocolos clínicos de actuación en las embarazadas diabéticas como población de riesgo.

▪ Se comprueba la necesidad de realizar más estudios longitudinales que permitan determinar los efectos a largo plazo del estado metabólico materno sobre los hijos, y poder identificar posibles estrategias de intervención en los niños para minimizar las consecuencias adversas de una gestación con riesgo metabólico sobre la descendencia.

### ***Agradecimiento***

Estudio financiado por el Ministerio de Innovación y Ciencia. Junta de Andalucía: Proyecto de Excelencia (P06-CTS-02341); Ministerio de Educación de España (Subvención SB2010-0025); Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2012-40254-C03-01); Subvención parcial de Abbott Nutrition, S.L., Granada, España.

### ***Bibliografía***

1. WHO | Obesity and overweight [Internet]. WHO. [citado 29 de noviembre de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
2. Prevalencia de obesidad en España: Estudio SEEDO 2000. (2003). Med Clin (Barcelona).120:608-12.

3. Estudio enKid (1998-2000). Barcelona. Masson, 2004.
4. Cedergren MI. (2004). Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol.* 103(2): 219e24.
5. Tieu J, Middleton P, McPhee AJ, Crowther CA. (2010). Screening and subsequent management for gestational diabetes for improving maternal and infant health. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Web]. John Wiley & Sons, Ltd. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD007222.pub2/abstract>
6. Barker DJP. (2007) Obesity and early life. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes* 8 Suppl 1:45-9. doi: 10.1111/j.1467-789X.2007.00317.x
7. Van Lieshout RJ, Taylor VH, Boyle MH. (2011). Pre-pregnancy and pregnancy obesity and neurodevelopmental outcomes in offspring: a systematic review. *Obes Rev* 12(5):e548-59. doi: 10.1111/j.1467-789X.2010.00850.x
8. Ornoy A, Reece EA, Pavlinkova G, Kappen C, Miller RK. (2015). Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev* 105(1):53-72. doi: 10.1002/bdrc.21090
9. Tanda R, Salsberry PJ, Reagan PB, Fang MZ. (2013). The impact of prepregnancy obesity on children's cognitive test scores. *Matern Child Health J.* 17(2):222-9. doi: 10.1007/s10995-012-0964-4

10. Petersen MB, Pedersen SA, Greisen G, Pedersen JF, Molsted-Pedersen L. (1988). Early growth delay in diabetic pregnancy: Relation to psychomotor development at age 4. *British Medical Journal*. 296:598–600.
11. Stenninger E., Flink R., Eriksson B., Sahlen C. (1998). Long term neurological dysfunction and neonatal hypoglycemia after diabetic pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 79: F174-F179.
12. Rodriguez A, Miettunen J, Henriksen TB, et al. (2008). Maternal adiposity prior to pregnancy is associated with ADHD symptoms in offspring: evidence from three prospective pregnancy cohorts. *Int J Obes (Lond)*. 32(3):550–557.
13. Rodriguez A. (2010). Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. *J Child Psychol Psychiatry*. 51(2):134–143.
14. Brion MJ, Zeegers M, Jaddoe V, et al. (2011). Intrauterine effects of maternal prepregnancy overweight on child cognition and behavior in 2 cohorts. *Pediatrics*. 127(1):e202–211.
15. Group NDD (1979) Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance. *Diabetes* 28(12):1039-57. doi: 10.2337/diab.28.12.1039
16. Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR, Leiva A de, Dunger DB, Hadden DR, et al. (2007). Summary and Recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 30(Supplement 2):S251-60. doi: 10.2337/dc07-s225

17. Achenbach PT, Rescorla PL. (2013). Achenbach System of Empirically Based Assessment. In: Volkmar FR (ed) *Encyclopedia of Autism Spectrum Disorders*, Springer New York, pp 31-9.
18. Torres-Espinola FJ, Berglund SK, García-Valdés LM, Segura MT, Jerez A, Campos D, Moreno-Torres R, Rueda R, Catena A, Pérez-García M, Campoy C. (2015). Maternal Obesity, Overweight and Gestational Diabetes Affect the Offspring Neurodevelopment at 6 and 18 Months of Age – A Follow Up from the PREOBE Cohort. *PLoS ONE* 10(7): e0133010. doi:10.1371/journal.pone.0133010
19. Perna R, Loughan AR, Le J, Tyson K. (2015). Gestational Diabetes: Long-Term Central Nervous System Developmental and Cognitive Sequelae. *Appl Neuropsychol Child* 4(3):217-20. doi: 10.1080/21622965.2013.874951.
20. Jo H, Schieve LA, Sharma AJ, Hinkle SN, Li R, Lind JN. (2015). Maternal prepregnancy body mass index and child psychosocial development at 6 years of age. *Pediatrics* 135(5):e1198-1209. doi: 10.1542/peds.2014-3058.
21. Smithers LG, Gibson RA, McPhee A, Makrides M. (2008). Effect of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of preterm infants on disease risk and neurodevelopment: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 87(4):912-20.

## The BDNF Val66Met genetic polymorphism does not modify the association between Body Mass Index (BMI) and Major Depression

Rivera M, Rovira P, Gutierrez B, Ching-López A, Molina E, Martín-Laguna MV, Aneiros-Giraldez G, Ibanez-Casas I, McKenney K, Ruiz-Pérez I, Rodríguez-Barranco M, Cervilla J

### Abstract

**Introduction:** Depression and obesity are highly prevalent diseases in the general population and leading causes of disease burden and disability worldwide. A recent meta-analysis has shown that obesity increases the risk of developing depression and that depression is a predictive factor of overweight and obesity, confirming a bidirectional relationship between both disorders. The association between the *BDNF* Val66Met polymorphism and depression has been described in several studies. Besides, this polymorphism has also been associated with eating behavior, eating disorders and body mass index (BMI). The aim of this study is to investigate the genetic influence of the

*BDNF* Val66Met polymorphism in relation to BMI in a population sample of individuals with depression versus controls.

**Methods:** We performed a case-control study including 277 individuals with depression and 825 healthy controls from the Granada and PISMA-ep studies from the region of Andalusia (Spain). The MINI interview was used to establish the diagnosis of depression. Height and weight data reported from each individual was used to calculate BMI using the formula:  $\text{weight}(\text{kg})/\text{height}(\text{m})^2$ . T-tests were used to analyze the association between BMI and depression. Linear regression models for quantitative traits assuming an additive genetic model were applied to test the association between the *BDNF* Val66Met polymorphism and BMI. Finally, we performed interaction analysis between the Val66Met polymorphism, BMI and depression. The statistical analyses were carried out with the software PLINK v1.06.

**Results:** We found a statistically significant association between BMI and depression. The individuals with depression had significantly higher BMI values compared to controls (cases: BMI=27.60 (SD=5.86); controls: BMI=26.68 (SD=4.45);  $t=-2.74$ ,  $p=0.006$ ). No significant differences were found in the allelic or genotypic frequencies distribution when depression cases and controls were compared. Linear regression analysis did not show a significant association between the Val66Met polymorphism and BMI, neither in the whole sample nor when cases and controls were analyzed separately. No interaction between the Val66Met polymorphism and depression in relation to BMI was found.

**Conclusions:** Our results show an association between BMI and depression confirming the results from previous studies. However, our study does not support the implication of the *BDNF* Val66Met polymorphism in the genetic relationship between BMI and depression.

## ***Introduction***

Major depression or depression is one of the most common mental illnesses and the second leading cause of disability worldwide, being the most usual cause of absenteeism from work and a major contributor to the burden on our health care systems [1,2]. According to the World Health Organization (WHO), more than 350 million people are affected around the world and lifetime prevalence estimates vary from 3% (Japan) and 16.9% (USA), varying usually between 8 and 12% [3].

On the other hand, obesity is also a complex disorder and a serious public health concern. According to the WHO more than 1900 million people (39% of the total world population) were overweight in 2014, of which 600 million (13%) were obese. Furthermore, this number is growing, and nowadays there are in the world more than the double of obese people than 30 years ago (WHO 2009).

There have been described in the literature multiple "co-morbidities" between depression and a large variety of disorders, such as Alzheimer, Parkinson, multiple sclerosis, stroke, cardiovascular disorder, chronic fatigue syndrome, rheumatoid arthritis, diabetes type 1 and 2, metabolic syndrome and obesity, among others. Specifically, depression and physical disorders are commonly comorbid, which has been recognized as an increasingly important clinical and global health issue [4].

A recent review on the comorbidity of depression and physical disorders showed that there is a high prevalence of depression in individuals with these disorders suggesting that depression may significantly impact the medical outcome of these patients, usually leading to a worse evolution of their baseline pathologies and to a higher mortality. Besides, patients with physical disorders are at higher risk of suffering depression [5].

Among these physical disorders, one of great interest is obesity, a problem not only with increasingly prevalence in high-income countries but also dramatically on the rise in low- and middle-income countries. In fact, depression and obesity are becoming main contributors to disease burden and disability worldwide [1].

There is solid evidence that obesity-related disorders are increased among depressed individuals [6]. In this context, an association between obesity and depression has been described, suggesting that higher body mass index (BMI) increases the risk for depression [7]. Moreover, people with depression are more likely to be overweight or obese compared to psychiatrically-healthy controls [6], particularly in individuals with atypical depression, in whom increased appetite and weight gain are more prevalent.

Although the association between depression and obesity has been repeatedly investigated in numerous studies, the reasons and direction of this association remains unclear [8]. Several mechanisms to explain why these two disorders frequently co-occur have been proposed. Firstly, people with obesity are more likely to become depressed due to psychological factors such as low self-esteem, body dissatisfaction, social stigma or eating patterns. Secondly, increased food intake, reduced physical activity and/or sedentary lifestyle, as well as antidepressant treatment are risk factors to induce weight gain in individuals with depression. Thirdly, both depression and obesity involve pathophysiological overlapping mechanisms, such as inflammation and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis dysfunction. Besides, both disorders may share some genetic variance [8-10].

The *BDNF* gene encodes for a secreted neurotrophin involved in different neural processes as supporting, protection and survival of neurons in the central nervous system (CNS) [11]. This neurotrophin also regulates energy balance and homeostasis, food intake, and feeding behavior [12]. The *BDNF* gene has also been implicated in neurogenesis during the early development and it has emerged as an important regulator of synaptogenesis and synaptic plasticity mechanisms underlying learning and memory in the adult CNS [11]. Furthermore, it regulates synaptic transmission and activity dependent plasticity [13].

This nerve growth factor has antidepressant-like effects in animals and may be implicated in the etiology of mood-related phenotypes [14]. In fact, it has been related to stress vulnerability, which poses it as a candidate gene to study organic disorders where stress is present, as obesity and eating disorders. Furthermore,

changes in BDNF concentrations have been found in different parts of the brain in patients of schizophrenia, bipolar disorder and depression [15].

A widely studied common genetic variant in the *BDNF* gene, the Val66Met polymorphism (also known as rs6265), has to be highlighted due to its functional implications. This single nucleotide polymorphism (SNP) entails not only protein structural changes but also functional changes in neural circuitries. This polymorphism has been considered as a risk factor for schizophrenia, major depression, ADHD, bipolar disorder and many other psychopathologies [16,17]. Particularly, genetic association studies of this SNP conducted in major depressive disorder (MDD) have yielded inconsistent results [14]. Two recent meta-analyses of the *BDNF* Val66Met polymorphism and MDD have shown no significant association of this variant with MDD [14,18]. However, Verhagen et al found that this polymorphism was of greater importance in the development of MDD in men compare to women [14]. Most recently, Hosang et al. performed a systematic review and meta-analysis of the interaction between stress and the *BDNF* Val66Met polymorphism, and found that Met allele significantly moderates the relationship between life stress and depression [19].

In a recent study investigating the involvement of *BDNF* in human psychopathology, Erns et al. identified five subjects with deletions encompassing the entire *BDNF* gene. Interestingly, the group with the deletion displayed varied phenotypes that included neurodevelopmental, behavioural and mood disorders, in addition to being obese or overweight [20].

Besides, candidate gene studies carried out in obesity have reported at least 127 candidate genes shown to be associated with obesity or obesity-related traits. From them, the most widely replicated BMI and obesity genes include the *BDNF* gene, among others (For a review see [21]).

In view of the involvement of the *BDNF* Val66Met polymorphism in depression and obesity, the aim of the present study was to investigate the influence of this variant on the association between depression and BMI.

## **Methods**

### **Study design and sample**

The sample included in this work comprises individuals from two studies, the GranadΣp [22] and PISMA-ep [23], both aiming to establish the prevalence of major psychiatric disorders such as schizophrenia and other psychosis, bipolar disorder and major depression in Andalusia and to identify genetic and environmental risk factors for such conditions.

The GranadΣp is a cross-sectional epidemiological study based on a representative sample of the adult population living in Granada (Andalusia, Spain). It was designed as a pilot study of a larger cross-sectional study which would cover the region of Andalusia, the PISMA-ep study. The individuals were selected from the general population using a sampling method based in regional subdivision of rural or urban areas. All participants with ages between 18 and 80 years were selected to participate in the study.

The exclusion criteria were similar in both studies: being outside this age range, having lived in Andalusia for less than a year, having difficulties to communicate fluently in Spanish, being too ill to be able to complete the interview, having a diagnosis of dementia or mental retardation, living in an institution, having moved or not living normally at the address we had been given by the users database, and erroneous data from the users database (for example an incomplete address). The participants excluded were replaced with others matched for age, sex and location.

Both studies used the same assessment methods. Information about clinical, psychological, socio-demographic, anthropometric measurements, medical conditions, life style and other environmental variables, such as stressful life events and childhood maltreatment, were obtained from each participant. Individuals who also agreed to participate in the genetic analysis gave specific informed consent and provided a biological sample. The common methodology and characteristics of both GranadΣp and PISMA-ep studies have been described in more detail elsewhere [22,23].

A total sample of 1,102 individuals, 277 cases (210 from the PISMA-ep and 67 from the GranadΣp) with a diagnosis of major depression and 825 psychiatrically healthy controls (338 from the PISMA-ep and 487 from the GranadΣp) were included in this study. All participants were of white European ancestry.

### **Clinical measures**

In both studies, the Mini-International Neuropsychiatric Interview (MINI) was used to ascertain the diagnosis of major depression. Interviews were conducted by fully trained psychologists and took place either in the participant's local primary healthcare center or in their homes.

The MINI is an interview which consists of 1 or 2 screening questions and depending on the answer of them, the individual will or will not proceed to answer the rest of that part of the test. This interview generates Axis I DSM-IV and ICD-10 diagnoses of major depression.

### **Phenotypic data**

In both studies, self-reported weight and height were obtained during the interview to calculate their body mass index (BMI), defined as weight in kilograms divided by height in meters squared ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

### **Genotyping**

A biological sample (saliva) was obtained from each participant using Oragene DNA saliva collection kit (OG-500; DNA genotek Ink). DNA was extracted following standard procedures. The DNA was stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and the concentration was measured by absorbance, using Infinite® M200 PRO multimode reader. (Tecan, Research Triangle Park, NC).

The samples from the GranadΣp study were genotyped using TaqMan® OpenArray™ Genotyping System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), according to the manufacturer's instructions. The raw data was analyzed with the TaqMan Genotyper v1.2 software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). A total of 91 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were

Rivera M, Rovira P, Gutierrez B, Ching-López A, Molina E, Martín-Laguna MV, Aneiros-Giraldez G, Ibanez-Casas I, McKenney K, Ruiz-Pérez I, Rodríguez-Barranco M, Cervilla J

analyzed in the Granada study. The genotypic information for the *BDNF* Val66Met polymorphism was extracted to be analyzed in this study.

The PISMA-ep study samples were genotyped for the *BDNF* Val66Met polymorphism using TaqMan® StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) following manufacturer's instructions. Raw data were analyzed with the system software.

### Statistical analysis

Pearson's Chi<sup>2</sup> tests were performed to compare distribution of sex, working status, marital status, educational level and *BDNF* Val66Met polymorphic variation between cases and controls. Additionally, T-Tests were carried out to analyze possible differences in age and BMI means between both groups. The SPSS statistical software was used to perform these analyses.

Hardy-Weinberg equilibrium was tested in the entire sample, and then separately in cases and in controls using PLINK v1.06 software [24].

Linear regression models for quantitative traits assuming an additive genetic model were carried out to test for the association between BMI and *BDNF* Val66Met polymorphism. Depression status, sex, age and province were included as covariates in the model. In a second step, linear regression models were performed separately in depressive cases and controls, including sex, age and province as covariates.

We also tested for the interaction between *BDNF* Val66Met polymorphism and depression on BMI. Statistical analyses were carried out using the statistical package PLINK v1.06.

We calculated statistical power using QUANTO software version 1.2.4 (<http://hydra.usc.edu/gxe/>). According to such calculations, our sample size had 80% power (confidence interval of P<0.05) to detect a gene-by-environment interaction effect of at least 1.8 if we assumed an additive genetic model, a prevalence for depression of 10%, a 38% prevalence for obesity (as reported by

Wang et al., 2011) and a frequency of the hypothesized risk allele (*BDNF Met66*) of 0.22 (as described in Spanish population by Gutiérrez et al., 2015) [25].

## **Results**

### **Participants**

Among 277 cases, 194 (70%) were women and 83 (30%) were men whereas in the control group, 46.10% were women and 53.90% were men. The distribution of sexes was found to differ significantly between both groups, with an excess of women in the group of cases ( $\chi^2= 47.76$ ,  $p<0.00001$ ). In addition, cases were significantly younger than controls (mean age  $\pm$  s.d.:  $49.27 \pm 15.17$  years and  $53.49 \pm 16.19$  years, respectively;  $t= 3.820$ ,  $p<0.001$ ). However, no differences were found for educational level ( $\chi^2= 2.986$ ,  $p= 0.560$ ).

### **Association between BMI and Major Depression**

There was a significant association between BMI and major depression ( $t=-2.736$ ,  $p=0.006$ ). Depressed individuals showed higher BMI values in comparison to controls (BMI in cases=  $27.60$  (SD=5.86); BMI in controls  $26.68$  (SD=4.45);  $t=-2.74$ ,  $p= 0.006$ ).

### **Association between *BDNF* Val66Met polymorphism and Major Depression**

*BDNF* Val66Met genotypic frequencies were found to be in Hardy Weinberg equilibrium in the whole sample ( $\chi^2 = 0.442$ ;  $df= 2$ ;  $p= 0.801$ ) and both in depressive cases ( $\chi^2 = 0$ ;  $df= 2$ ;  $p=1$ ) and controls ( $\chi^2= 0.577$ ;  $df= 2$ ;  $p= 0.75$ ), supporting absence of genotyping artifacts. No significant differences in the distribution of allelic ( $\chi^2 = 1.036$ ;  $df= 1$ ;  $p= 0.307$ ) or genotypic ( $\chi^2 = 1.376$ ;  $df= 2$ ;  $p= 0.503$ ) frequencies were found when comparing depressive cases and controls (Table 1). Association results did not change after adjusting by sex and age.

**Table 1.** *BDNF* Val66Met allelic and genotypic frequencies in cases with major depression and controls

	<b>Cases</b>	<b>Controls</b>
<b>Allelic frequencies</b>		
Met	105 (18.95%)	346 (20.97%)
Val	449 (81.05%)	1,304 (79.03%)
$\chi^2 = 1.04, df = 1, p = 0.301$		
	<b>Cases</b>	<b>Controls</b>
<b>Genotypic frequencies</b>		
Met/Met	10 (3.61%)	31 (3.76%)
Met/Val	85 (30.69%)	284 (34.42%)
Val/Val	182 (65.70%)	510 (61.82%)
$\chi^2 = 1.38; df = 2; P = 0.503$		

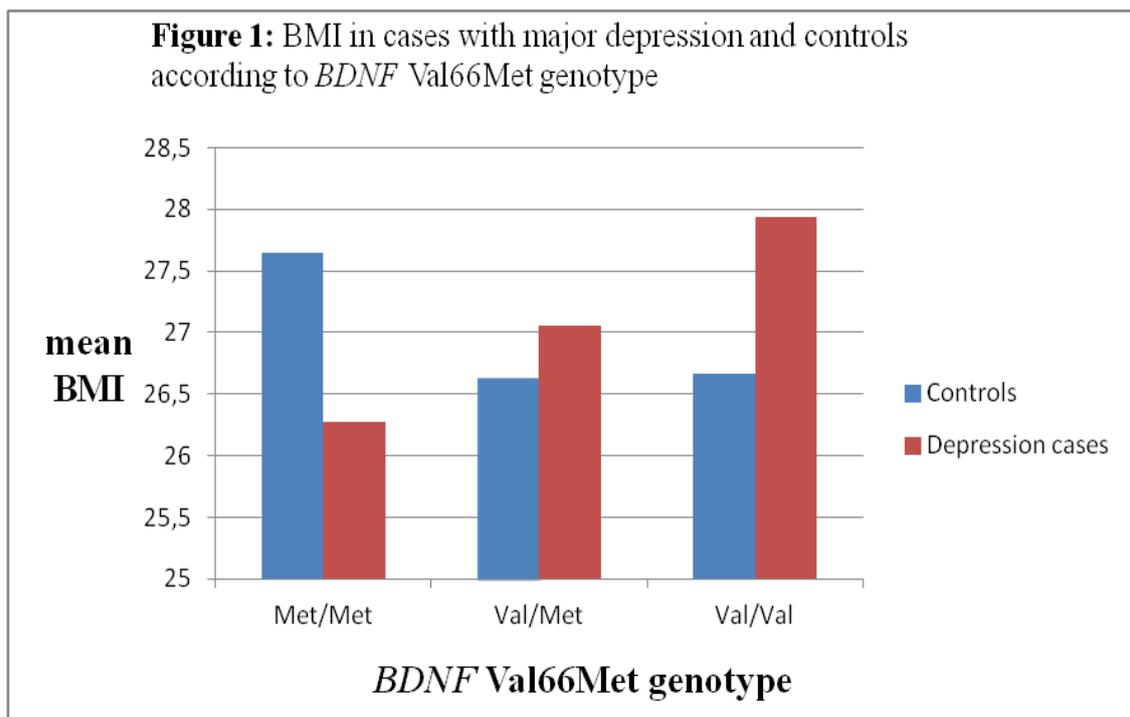
### **Association between *BDNF* Val66Met polymorphism and BMI**

BMI was not found to differ according to *BDNF* Val66Met genotypes ( $\beta = -0.126, p = 0.628$ ). These results remained robust after adjusting by sex, age, province or depression status ( $\beta = -0.0388, p = 0.875$ ). No evidence of association was found between BMI and *BDNF* Val66Met polymorphism when cases and

controls were analyzed separately (Cases:  $\beta = -0.531$ ,  $p = 0.382$ ; Controls:  $\beta = 0.173$ ,  $p = 0.504$ ).

### Interaction between *BDNF* Val66Met polymorphism and Major Depression on BMI

We did not find a significant interaction between genotype and major depression in relationship to BMI ( $\beta = -0.7079$ ,  $p = 0.229$ ) taking into account sex, age and province as covariates (Figure 1).



### Discussion

We have investigated the influence of the *BDNF* Val66Met polymorphism on the association between depression and BMI in a general population sample of depressed cases and controls from the Granada $\Sigma$ p and PISMA-ep studies [22,23].

There were statistically significant differences in BMI between depressed cases and controls, being higher in individuals with depression. These results agree with the ones reported in previous studies [26,28]. The fact that individuals with depression have higher BMI than controls could be due to different reasons including side effects of antidepressant treatment, sedentary lifestyle or an increase of food intake. Genetic causes can also contribute to the comorbidity between depression and obesity [9].

We did not find a significant association between the Val66Met polymorphism and depression. These results are in line with previous studies [18,29]. Association studies of the *BDNF* Val66Met polymorphism in MDD have reported conflicting results. A meta-analysis performed by Verhagen et al in 2010, investigated the association of the *BDNF* Val66Met polymorphism with MDD in 2,812 patients and 10,843 controls from 14 case-control studies. They found significant allelic (Met vs Val) and genotypic (Met/Met vs Val/Val) associations with MDD in men. However, the overall meta-analysis did not find any significant genetic association between this polymorphism and MDD [14]. Besides, a more recent meta-analysis including 23 studies provided no evidence of the association of the Val66Met polymorphism with major depression. Only 2 studies included in the meta-analysis showed significant associations with major depression, but the conclusions were opposed [18].

The association between the Val66Met polymorphism and BMI was also not statistically significant in our study. These results are in line with other reports [30-36]. However, when we analyzed the group of cases and controls separately, we found in the group of cases that individuals carrying the Val/Val genotype had higher BMI values than individuals with Val/Met or Met/Met genotypes. In controls, the individuals carrying the Met/Met genotype were the ones with higher BMI values. Previous studies have found Met allele [37] or Met/Met genotype [38] associated with obesity. On the contrary, other studies found an association between the Met/Met genotype with lower BMI [39,40]. However, the Val allele and the Val/Val genotype [41,42] have been reported to be associated with increased BMI.

Our study did not find a significant interaction between the *BDNF* Val66Met polymorphism and major depression in relation to BMI. To our knowledge, there are no previous studies investigating this interaction. However, a previous study investigating the genetic relationship between the *FTO* gene, BMI and major depression, in a sample consisting of 3,734 depression cases and 2,499 controls, found an interaction between several polymorphisms in the *FTO* gene, BMI and major depression. The effect of the *FTO* gene variants on BMI was increased in those subjects who had experienced depression [27].

This study has certainly some limitations that deserve to be mentioned. The main limitation of our study is its sample size, which supposes a limited power to detect small and even moderate effects. However, other studies with higher number of individuals came to the same conclusion when the association between BMI and the Val66Met polymorphism was tested [41]. Another limitation of this study is the use of self-reported height and weight measures to calculate BMI. However, a previous study including self-reported data and height and weight directly measured, found the same pattern of results [27].

This is the first study investigating the relationship between the *BDNF* Val66Met polymorphism, BMI and major depression concurrently. Our results show an association between BMI and depression confirming the results from previous studies. However, our study does not support an interaction between the *BDNF* Val66Met polymorphism, BMI and major depression. Future studies involving bigger sample sizes will be required to clarify the role of this variant in the relationship between BMI and major depression.

## **References**

1. Mathers, C D, Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*. 3(11), 2011–2030. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>
2. Scott KM, McGee MA, Wells JE, Oakley Browne MA. (2008). Obesity and mental disorders in the adult general population. *J Psychosom Res*. 64(1):97-105.
3. Demyttenaere K, Bruffaerts R, Posada-Villa J, Gasquet I, Kovess V, Lepine JP, et al. (2004). Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *JAMA*. 291(21):2581-2590.
4. Maes M, Kubera M, Obuchowiczwa E, Goehler L, Brzeszcz J. (2011). Depression's multiple comorbidities explained by (neuro) inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. *Neuro Endocrinol Lett*. 32(1):7-24.
5. Kang HJ, Kim SY, Bae KY, Kim SW, Shin IS, Yoon JS, Kim JM. (2015). Comorbidity of depression with physical disorders: research and clinical implications. *Chonnam Medical Journal*. 51(1): 8–18. <http://doi.org/10.4068/cmj.2015.51.1.8>
6. Farmer A, Korszun A, Owen M J, Craddock N, Jones L, Jones I, McGuffin, P. (2008). Medical disorders in people with recurrent depression. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*. 192(5): 351–5. <http://doi.org/10.1192/bjp.bp.107.038380>
7. Hung CF, Rivera M, Craddock N, Owen MJ, Gill M, Korszun A, McGuffin P. (2014). Relationship between obesity and the risk of clinically significant depression: Mendelian randomisation study. *The British Journal of Psychiatry* :

The Journal of Mental Science. 205(1): 24–8.  
<http://doi.org/10.1192/bjp.bp.113.130419>

8. Luppino FS, de Wit LM, Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, Penninx BWJH, Zitman FG. (2010). Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Archives of General Psychiatry*, 67(3): 220–9. <http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.2>
9. Afari N, Noonan C, Goldberg J, Roy-Byrne P, Schur E, Golnari G, Buchwald D. (2010). Depression and obesity: Do shared genes explain the relationship? *Depression and Anxiety*, 27(9): 799–806. <http://doi.org/10.1002/da.20704>
10. Penninx BW, Milaneschi Y, Lamers F, Vogelzangs N. (2013). Understanding the somatic consequences of depression: biological mechanisms and the role of depression symptom profile. *BMC Med*. 15;11:129-7015-11-129.
11. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*. 9;3:1.
12. Rosas-Vargas H, Martinez-Ezquerro JD, Bienvenu T. (2011). Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Arch Med Res*. 42(6):482-494.
13. Bramham CR, Messaoudi E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol*. 76(2):99-125.
14. Verhagen M, van der Meij A, van Deurzen PA, Janzing JG, Arias-Vasquez A, Buitelaar JK, et al. (2010). Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity. *Mol Psychiatry*: 15(3):260-271.
15. Thompson M, Weickert CS, Wyatt E, Webster MJ. (2011). Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD(67) mRNA expression in the hippocampus of individuals

with schizophrenia and mood disorders. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*. 36(3):195-203.

16. Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. (2002). The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet*. 71(3):651-655.
17. Chen ZY, Bath K, McEwen B, Hempstead B, Lee F. (2008). Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. *Novartis Found Symp*. 289:180-8; discussion 188-95.
18. Gyekis JP, Yu W, Dong S, Wang H, Qian J, Kota P, et al. (2013). No association of genetic variants in BDNF with major depression: a meta- and gene-based analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 162B(1):61-70.
19. Hosang GM, Shiles C, Tansey KE, McGuffin P, Uher R. (2014). Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 16;12:7-7015-12-7.
20. Ernst C, Marshall CR, Shen Y, Metcalfe K, Rosenfeld J, Hodge JC, et al. (2012). Highly penetrant alterations of a critical region including BDNF in human psychopathology and obesity. *Arch Gen Psychiatry*. 69(12):1238-1246.
21. El-Sayed Moustafa JS1, Froguel P. (2013). From obesity genetics to the future of personalized obesity therapy. *Nat Rev Endocrinol*. 9(7):402-13. doi: 10.1038/nrendo.2013.57. Epub 2013 Mar 26.
22. Ching-Lopez A, Cervilla J, Rivera M, Molina E, McKenney K, Ruiz-Perez I, Gutierrez, B. (2015). Epidemiological support for genetic variability at hypothalamic-pituitary-adrenal axis and serotonergic system as risk factors for major depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 11, 2743–2754.

23. Cervilla JA, Ruiz I, Rodríguez-Barranco M, Rivera M, Ibáñez-Casas I, Molina E, Valmisa E, Carmona-Calvo J, Moreno-Küstner B, Muñoz-Negro JE, Ching-López A, Gutiérrez B. (2016). Protocol and methodology of Study epidemiological mental health in Andalusia: PISMA-ep. *Rev Psiquiatr Salud Ment.* 9(4):185-194. doi: 10.1016/j.rpsm.2015.11.004.
24. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M A R, Bender D, Sham PC. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics.* 81(3), 559–75. <http://doi.org/10.1086/519795>
25. Gutiérrez B, Bellón JÁ, Rivera M, Molina E, King M, Marston L, Cervilla J. (2015). The risk for major depression conferred by childhood maltreatment is multiplied by BDNF and SERT genetic vulnerability: a replication study. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN.* 40(3), 187–96.
26. Scott KM, McGee MA, Wells JE, Oakley Browne MA. (2008). Obesity and mental disorders in the adult general population. *J Psychosom Res.* 64(1):97-105.
27. Rivera M, Cohen-Woods S, Kapur K, Breen G, Ng MY, Butler AW, McGuffin P. (2012). Depressive disorder moderates the effect of the FTO gene on body mass index. *Molecular Psychiatry.* 17(6): 604–11. <http://doi.org/10.1038/mp.2011.45>
28. Rivera M, Locke AE, Corre T, Czamara D, Wolf C, Ching-Lopez A, Milaneschi Y, Kloiber S, Cohen-Woods S, Rucker J, Aitchison KJ, Bergmann S, Boomsma DI, Craddock N, Gill M, Holsboer F, Hottenga JJ, Korszun A, Kutalik Z, Lucae S, Maier W, Mors O, Müller-Myhsok B, Owen MJ, Penninx BWJH, Preisig M, Rice J, Rietschel M, Tozzi F, Uher R, Vollenweider P, Waeber G, Willemsen G, Craig IW, Farmer AE, Lewis CM, Breen G, McGuffin P. (2011). Interaction between the FTO gene, body mass index and depression: meta-analysis of 13701

individuals. *Br J Psychiatry*. 211(2):70-76. doi: 10.1192/bjp.bp.116.183475. Epub 2017 Jun 22.

29. Tsai SJ, Cheng C-Y, Yu Y W-Y, Chen T-J, Hong C-J. (2003). Association study of a brain-derived neurotrophic-factor genetic polymorphism and major depressive disorders, symptomatology, and antidepressant response. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics : The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 123B(1), 19–22. <http://doi.org/10.1002/ajmg.b.20026>
30. Arija V, Ferrer-Barcala M, Aranda N, Canals J. (2010). BDNF Val66Met polymorphism, energy intake and BMI: a follow-up study in schoolchildren at risk of eating disorders. *BMC Public Health*, 10(Mim 113505), 363. <http://doi.org/10.1186/1471-2458-10-363>
31. Friedel S, Horro FF, Wermter AK, Geller F, Dempfle A, Reichwald K, et al. (2005). Mutation screen of the brain derived neurotrophic factor gene (BDNF): identification of several genetic variants and association studies in patients with obesity, eating disorders, and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 5;132B(1):96-99.
32. Gunstad J, Schofield P, Paul RH, Spitznagel MB, Cohen RA, Williams LM, et al. (2006). BDNF Val66Met polymorphism is associated with body mass index in healthy adults. *Neuropsychobiology*. 53(3):153-156.
33. Hong K-W, Lim J-E, Go M J, Shin Cho Y, Ahn Y, Han B-G, Oh B. (2012). Recapitulation of the association of the Val66Met polymorphism of BDNF gene with BMI in Koreans. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 20(9): 1871–5. <http://doi.org/10.1038/oby.2011.352>
34. Marti A, Santos JL, Gratacos M, Moreno-Aliaga MJ, Maiz A, Martinez JA, et al. (2009). Association between leptin receptor (LEPR) and brain-derived

neurotrophic factor (BDNF) gene variants and obesity: a case-control study. *Nutr Neurosci.* 12(4):183-188.

35. Nikolac Perkovic M, Mustapic M, Pavlovic M, Uzun S, Kozumplik O, Barisic I, et al. (2013). Lack of association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and body mass index change over time in healthy adults. *Neurosci Lett.* 17;545:127-131.
36. Zegers D, Hendrickx R, Verrijken A, Van Hoorenbeeck K, Van Camp JK, de Craemer V, et al. (2014). Screening for genetic variants in BDNF that contribute to childhood obesity. *Pediatr Obes.* 9(1):36-42.
37. Skledar M, Nikolac M, Dodig-Curkovic K, Curkovic M, Borovecki F, Pivac N. (2012). Association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met and obesity in children and adolescents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 10;36(1):136-140.
38. Beckers S, Peeters A, Zegers D, Mertens I, Van Gaal L, Van Hul W. (2008). Association of the BDNF Val66Met variation with obesity in women. *Mol Genet Metab.* 95(1-2):110-112.
39. Shugart YY, Chen L, Day IN, Lewis SJ, Timpson NJ, Yuan W, et al. (2009). Two British women studies replicated the association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and BMI. *Eur J Hum Genet.* 17(8):1050-1055.
40. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadottir A, et al. (2009). Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet.* 41(1):18-24.

Rivera M, Rovira P, Gutierrez B, Ching-López A, Molina E, Martín-Laguna MV, Aneiros-Giraldez G, Ibanez-Casas I, McKenney K, Ruiz-Pérez I, Rodríguez-Barranco M, Cervilla J

41. Hong KW, Lim JE, Go MJ, Shin Cho Y, Ahn Y, Han BG, et al. (2012). Recapitulation of the association of the Val66Met polymorphism of BDNF gene with BMI in Koreans. *Obesity (Silver Spring)*. 20(9):1871-1875.
  
42. Wu L, Xi B, Zhang M, Shen Y, Zhao X, Cheng H, et al. (2010). Associations of six single nucleotide polymorphisms in obesity-related genes with BMI and risk of obesity in Chinese children. *Diabetes*. 59(12):3085-3089.



## ENCUENTROS EN NEUROCIENCIAS VOL . IV

Esta publicación recoge las ponencias presentadas por los jóvenes investigadores durante las VI Jornadas Científicas, organizadas en marzo del 2016 por el Instituto de Neurociencias “Federico Olóriz” de la Universidad de Granada en colaboración con el Parque de las Ciencias de Granada.

Estos encuentros bianuales se celebran con el propósito de conocer los últimos descubrimientos e investigaciones que se están desarrollando, así como las diferentes técnicas y herramientas empleadas para ello. Estas Jornadas facilitan la difusión de los trabajos científicos en un ambiente distendido y divulgativo, favoreciendo posibles colaboraciones, publicaciones y/o proyectos conjuntos.

Nuestro agradecimiento a la dirección del Instituto de Neurociencias por su compromiso en la organización de estas Jornadas y a todos los coautores sin los cuales no hubiera sido posible la recopilación de estas páginas.

