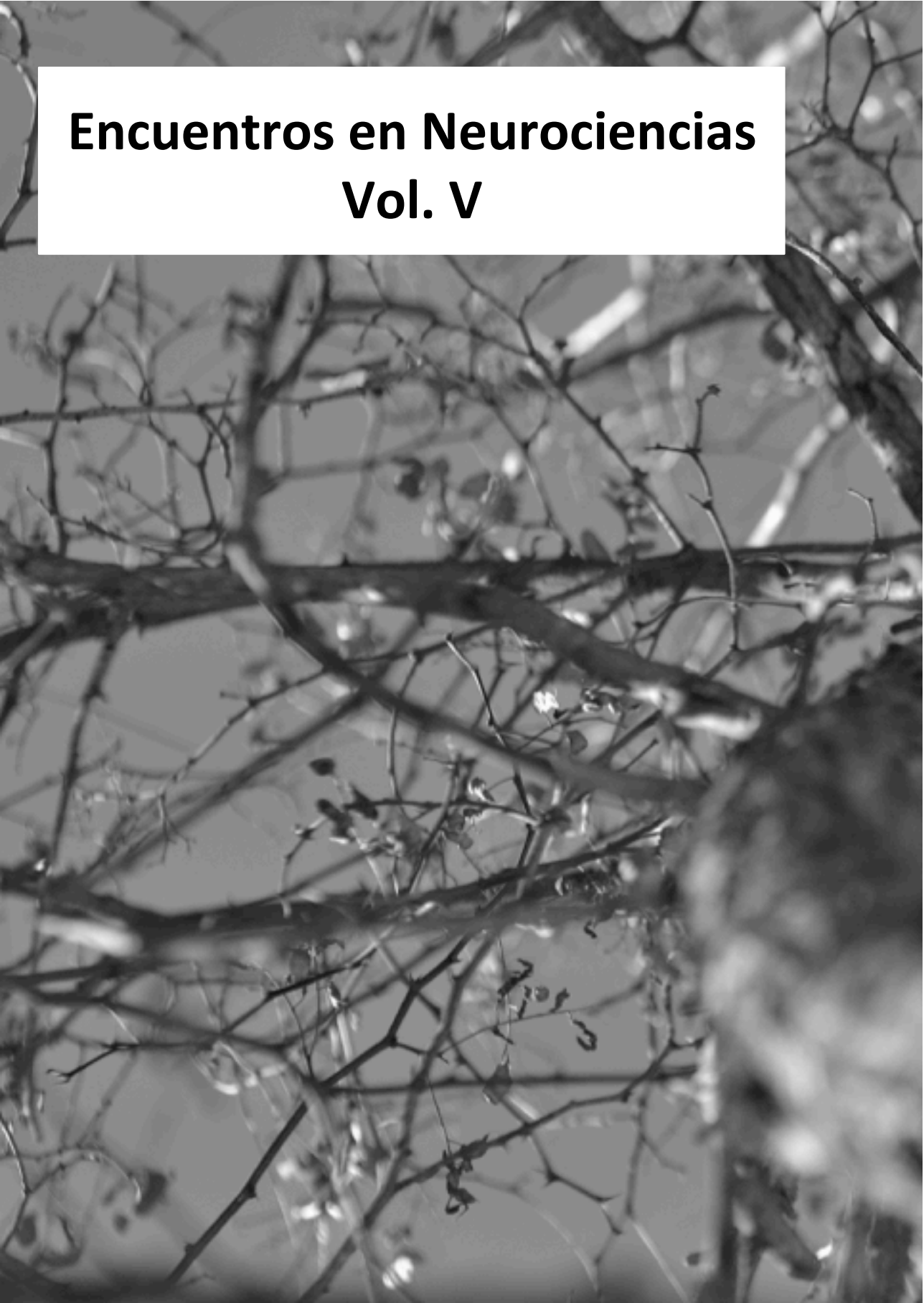
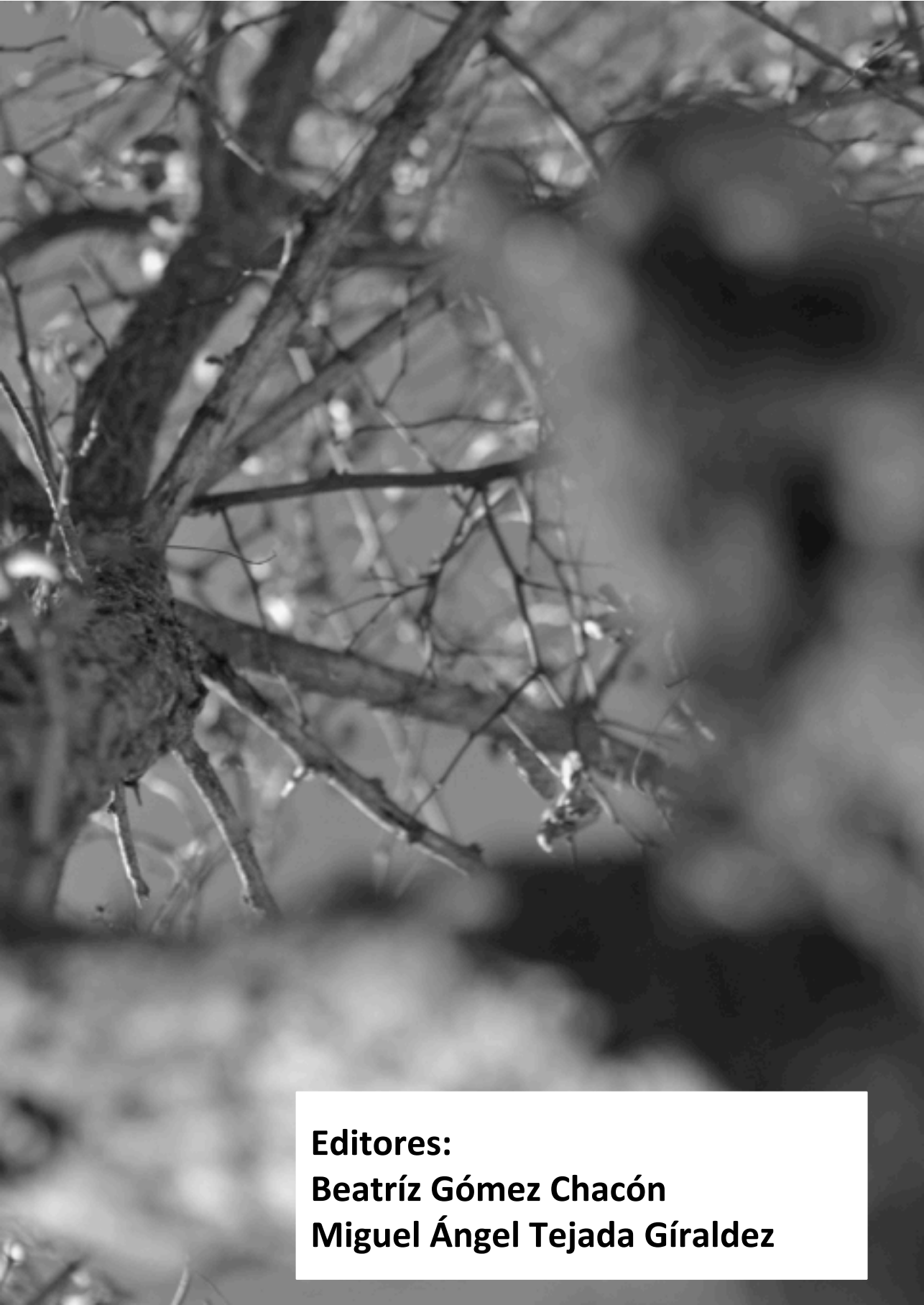
V ENCUENTRO EN NEUROCIENCIAS

Editores:
Beatriz Gómez Chacón
Miguel Ángel Tejada Giráldez

Encuentros en Neurociencias Vol. V





Editores:
Beatríz Gómez Chacón
Miguel Ángel Tejada Gíraldez

©De cada capítulo sus autores.

Ediciones sider

Diseño cubierta e interior:

Beatriz Gómez Chacón

Miguel ángel tejada Giráldez

Ilustración de cubierta:

Beatriz Gómez Chacón

ISBN: 978-84-943468-0-4

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. V

Granada, 2018

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Instituto de Neurociencias
Universidad de Granada

Índice

Relación de autores III

Capítulo 1: **Dimensiones psicóticas en población general.** Lozano V, Cervilla JA. 1

Capítulo 2: **Relación entre el gen FTO, índice de masa corporal y depresión.** Rodríguez-Hidalgo M, Agudo M, Gutierrez B,Cervilla J, Ching-López A, Molina E, Martín-Laguna MV, Ibanez-Casas I, McKenney K, Ruiz-Pérez I, Rodríguez-Barranco M, Rivera M. 13

Capítulo 3: **Migraña episódica y crónica: aspectos terapéuticos y psicosociales.** Lagoa-Maya S, García-Leiva JM, Gómez Camello A, Calandre EP. 33

Capítulo 4: **El papel de los probióticos y prebióticos durante el neurodesarrollo infantil.** Cerdó T, Campoy C. 45

Capítulo 5: **Alteraciones genéticas, autofagia y disfunción lisosomal en la enfermedad de Parkinson.** Ruz C, Bandrés-Ciga S, Barrero FJ, Pelegrina J, Vives F, Durán R. 65

Capítulo 6: **¿Afecta el Cannabis a la Memoria y la Atención?** Robles-López E, Salinero-Bachiller M, Iribar MC, Peinado J. 83

Capítulo 7: **Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo: obtención, diferenciación y aplicación en lesiones cerebrales y medulares.** Hernández R, Jiménez-Luna C, Cabeza L, Caba O, Prados JC, Melguizo C. 101

Capítulo 8: **Mecanismos de resistencia en glioblastoma multiforme.** Perazzoli G, Cabeza L, Jiménez-Luna C, Ortiz R, Prados J, Melguizo C. 125

Capítulo 9**: Nanomedicina en el tratamiento del glioblastoma multiforme.** Cabeza L, Perazzoli G, Hernández R, Ortiz R, Melguizo C, Prados JC. 141

Capítulo 10: **Modulación de la sensibilización de los nociceptores C por el receptor sigma-1.** Ruiz-Cantero MC, 157

Montilla-García Á, Perazzoli G, Sánchez-Fernández C, Baeyens JM, Cobos EJ.

Capítulo 11: **El antagonismo farmacológico del receptor sigma-1 reduce el dolor neuropático inducido por la lesión parcial del nervio ciático.** Bravo-Caparrós I, Nieto FR, Perazzoli G, Baeyens JM, Cobos E. 175

Capítulo 12: **Los receptores sigma-1 controlan la analgesia opioide mediada por células inmunitarias durante la inflamación.** Tejada MA, Montilla-García A, Cronin SJ, Cikes D, Sánchez-Fernández C, González-Cano R, Ruiz-Cantero MC, Penninger JM, Vela JM, Baeyens JM, Cobos EJ. 189

Capítulo 13: **Modificaciones de la memoria asociadas a la edad: el caso de los "super-ancianos".** Gómez Chacón B, Gallo M. 207

Capítulo 14: **La neofobia y su atenuación: relación entre el sistema gustativo y la memoria de reconocimiento en roedores.** Menchén-Márquez S, Gallo M. 235

Capítulo 15: **Modelo de abuso de alcohol en ratones: Desarrollo del paradigma "Driking in the Dark" en cepa de baja preferencia.** Ruiz-Leyva L, Jiménez García, AM, Morón I, Cendán CM. 249

Capítulo 16: **Estudio mediante ERGmf de pacientes con sospecha de toxicidad retiniana por hidroxicloroquina.** Ruiz Ortega J, Sáez Moreno JA, Rodríguez-Ferrer JM. 255

Capítulo 17: **La atención como mecanismo cerebral compensador del deterioro de la percepción visual en el envejecimiento.** Rodríguez-Aguilera JM, Rodríguez-Ferrer JM. 265

Relación de autores

Agudo, M. Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Baeyens, JM. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Bandrés-Ciga, S. Laboratorio de Neurogenética, NIA, NIH, Bethesda, MD, EE. UU.

Barrero, FJ. Unidad de Trastornos del Movimiento, Hospital Universitario Campus de la Salud, Granada, España.

Bravo-Caparrós, I. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Caba, O. Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS), Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada.

Cabeza, L. Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS), Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada.

Calandre, EP. Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Campoy, C. Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Centro de Excelencia de Investigación Pediátrica (EURISTIKOS), Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto Carlos III (Nodo de Granada), Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Cendán, CM. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Cerdó, T. Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Centro de Excelencia de Investigación Pediátrica (EURISTIKOS), Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Cervilla, J. Departamento de Psiquiatría, Facultad de Medicina, Unidad de Hospitalización Psiquiátrica, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM).

Ching-López, A. Departamento de Psiquiatría, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

Cikes, D. Instituto de Biotecnología Molecular, 1030 Viena, Austria.

Cobos, EJ. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada, instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento, Universidad Autónoma de Madrid.

Cronin, SJ. Instituto de Biotecnología Molecular, 1030 Viena, Austria.

Durán, R. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Gallo, M. Departamento de Psicología, Facultad de Psicología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

García-Leiva, JM. Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Gómez Camello, A. Consulta de Cefaleas. Hospital Campus de la Salud, Granada.

Gómez-Chacón, B. Departamento de Psicología, Facultad de Psicología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

González-Cano, R. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Gutiérrez, B. Departamento de Psiquiatría, Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Hernández, R. Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS), Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada.

Ibanez-Casas, I. Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Iribar, MC. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología III, Facultad de Medicina, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Jiménez García, AM. Departamento de Psicología Experimental, Facultad de Psicología, Universidad de Granada.

Jiménez-Luna, C. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada.

Lagoa-Maya, S. Máster en Neurociencias Básicas, Aplicadas y Dolor, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Lozano, V. Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Universidad de Granada

Martín-Laguna, MV. Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

McKenney, K. Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Mechén-Márquez, S: Departamento de Psicología, Facultad de Psicología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Melguizo, C. Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS), Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada.

Molina, E. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada.

Montilla-García, A. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Morón, I. Departamento de Psicobiología, Centro de Investigación Mente, Cerebro y Comportamiento (CIMCYC), Universidad de Granada.

Nieto, FR. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Ortiz, R. Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS), Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada.

Peinado, J. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología III, Facultad de Medicina, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Pelegrina J. Unidad de Trastornos del Movimiento, Hospital Universitario Campus de la Salud, Granada, España.

Penninger, JM. Instituto de Biotecnología Molecular (Viena, Austria).

Perazzoli, G. Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS), Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada.

Prados, JC. Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS), Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada.

Rivera, M. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Robles-López, E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Biología Molecular e Inmunología III, Universidad de Granada.

Rodríguez-Aguilera, JM. Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

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

Rodríguez-Ferrer, JM. Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Rodríguez-Hidalgo, M. Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Ruiz-Ortega, J. Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Ruiz-Cantero, MC. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Ruiz-Leyva, L. Departamento de Psicología Experimental, Facultad de Psicología, Universidad de Granada.

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

Ruz, C. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Sáez-Moreno, JA. Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Salinero-Bachiller, M. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Biología Molecular e Inmunología III, Universidad de Granada.

Sánchez-Fernández, C. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Tejada, MA. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Vela, JM. Desarrollo de fármacos y preclínico, Laboratorios Dr. Esteve, Barcelona

Vives, F. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada.

Capítulo 1

Dimensiones psicóticas en población general

Lozano V, Cervilla JA

Resumen

Introducción. La evidencia confirma que la psicosis es un fenómeno multidimensional y que estas dimensiones psicóticas pueden encontrases incluso en población general. Sin embargo, no hay consenso sobre cuales seria están dimensiones. Esta revisión examina la literatura que en población no clínica analiza las dimensiones psicóticas existentes, con el objetivo de determinar cuáles son los componentes que se presenta con mayor frecuencia en personas sin diagnóstico psiquiátrico.

Métodos. Se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos de artículos publicados entre 2005 y 2015, cuya temática estuviera relacionada con la estructura psicótica dimensional en población subclínica. Los estudios fueron incluidos si: (a) incluían niños o adultos (≥10 años) sin diagnóstico de enfermedad mental (b) la evaluación psicopatológica se realizaba a través de escalas estandarizadas (c) el análisis estadístico incluía un análisis de componentes principales, un análisis factorial, o un modelo de ecuaciones estructurales (d) son artículos en Inglés.

Resultados. Basándonos en la descripción de los síntomas agrupamos en 5 dimensiones: POSITIVA (paranoia, ideas de auto-referencia, alucinaciones y pensamiento mágico), NEGATIVA (pérdida de deseo social, afecto aplanado y abulia), MANIA (grandiosidad e hiperactividad), DESORGANIZACIÓN (comportamiento y/o discurso raros, y desorganización conceptual) y DEPRESIÓN. Los síntomas que se presentaron con mayor frecuencia fueron aquellos comprendidos dentro de la dimensión positiva, frente a la dimensión de desorganización.

Discusión: Estos resultados pueden tener también algunas consecuencias a nivel teórico. Tal y como comentábamos en la introducción, una de las corrientes teóricas que más apoyo está recibiendo, es aquella que defiende la existencia de un *continuum* psicótico. Donde los síntomas psicóticos serían los mismos en pacientes que en población general, sólo que esta última esas experiencias son menos intensas o se acompañan de menor convicción.

Conclusiones. A pesar de las limitaciones metodológicas, nuestros resultados pueden ayudar a los clínicos a identificar los síntomas psicóticos más frecuentes en población general sana. Lo cual facilitaría un seguimiento previniendo las primeras manifestaciones del desarrollo de un trastorno psicótico.

Introducción

La psicosis es un término genérico que se refiere a un estado mental descrito como pérdida de contacto con la realidad. Habitualmente, las personas que experimentan psicosis pueden presentar alucinaciones, delirios, cambios en su personalidad o pensamiento desorganizado entre otros síntomas. Estos síntomas pueden ir acompañados por un comportamiento inusual, así como por dificultades sociales. En este contexto, muchas personas tienen experiencias inusuales y de distorsión de la realidad en algún momento de sus vidas, sin volverse discapacitados o ni siquiera angustiados por esas experiencias. Basandonos, en que estas experiencias inusuales también se producen en población no clínica, ciertos autores argumentan que la psicosis no esta fundamentalmente separada de una conciencia normal, sino mas bien es un *continuum* (1). Desde esta perspectiva, las personas que son diagnosticadas clínicamente como psicóticas pueden estar teniendo simplemente experiencias particularmente intensas o angustiantes (2, 3).

Los estudios de prevalencia muestran que los síntomas psicóticos en población sana, llamados también síntomas subclínicos, son mucho más frecuentes que las enfermedades psicóticas (4, 5). Mientras que la esquizofrenia sólo afecta al 1% de la ciudadanía, los síntomas psicóticos subclínicos pueden ser experimentados por el 33,2% de la población general (6). Este creciente interés por los síntomas psicóticos subclínicos, surge de la evidencia que demuestra que las personas que experimentan síntomas psicóticos no diagnosticables presentan un 3,5 más de riesgo de desarrollar psicosis a lo largo de su vida, que aquellas que nunca las han

experimentado (7). Además, experimentar síntomas psicóticos subclínicos también se asocia con el desarrollo de distintas enfermedades afectivas, con el abuso de sustancias o con un alto riesgo de conductas suicidas (8-11).

Por otro lado, los últimos avances en el estudio de la psicosis defienden que más que un fenómeno unidimensional, la psicosis es un compendio de dimensiones (12, 13). En este punto, es importante aclarar que una dimensión es un grupo de síntomas que ocurren con más frecuencia de manera conjunta, que de manera aislada. Sin embargo, actualmente no existe un acuerdo de cuantas y cuáles serían las dimensiones que conformarían la psicosis. Anquen, existen modelos que defiende que la psicosis se compone por dos, tres o cuatro dimensiones, uno de los modelos más replicados es el de los cinco factores (14–20). A pesar de que el nombre de los factores o dimensiones puede variar de unos autores a otros, en general coinciden en señalar que la psicosis se compone por: la dimensión positiva, la dimensión negativa, la dimensión cognitiva, la manía y la depresión. En esta línea, varios estudios con muestras de pacientes con distintos diagnósticos psicóticos (esquizofrenia, trastorno delirante o trastorno esquizoafectivo) o con distintas nacionalidades, confirman que el modelo que mejor se adapta a los datos es el modelos de las cinco dimensiones (21, 22). Es tanta la influencia que tiene la teoría de los factores, que actualmente a desbancado al modelo categorial en el manual diagnóstico de trastornos mentales (DSM-5) (23).

Siguiendo la hipótesis del *continuum,* si la única diferencia entre las experiencias psicóticas en la población general y en los pacientes, es la intensidad y la convicción con la que las viven estas experiencias, esperaríamos que al igual que en los enfermos la psicosis más que un concepto unitario fuera un compendio de dimensiones. No obstante, como sucede con la población clínica no existe un modelo de factores consensuado (24). La mayor controversia se encuentra relacionada con el debate acerca de si el modelo factorial subclínico bebería incluir al factor afectivo. El factor afectivo hace referencia a la dimensión de manía y depresión (4, 25, 26).

En cualquier caso, la presencia de sintomatología psicótica constituye un factor de riesgo para el desarrollo de psicosis. Desde esta perspectiva, identificar cuáles son los síntomas o conjunto de síntomas psicóticos que aparecen en la población subclínica resulta esencial. Ya que, actualmente se sabe que el desarrollo de

enfermedades psicóticas depende de varias dimensiones (27), sería interesante saber en qué medida están representadas las dimensiones psicóticas presentes en poblaciones clínicas en población sin diagnostico psicopatológico.

En el presente estudio, quisimos explorar cuales eran las dimensiones psicóticas más reportadas en población sin diagnóstico clínico. Así, este trabajo supuso un esfuerzo por poner en común los resultados obtenidos en investigaciones que analizan la estructura dimensional de la psicosis subclínica. Con este objetivo, revisamos los artículos que estudian desde una aproximación dimensional la psicosis en población general, publicados entre 2005 y 2015.

De manera indirecta, dado que algunas investigaciones previas han evidenciado que el modelo factorial en pacientes tiene una estructura muy similar a la encontrada en población general (28), los resultados de nuestra investigación servirán para corroborar esta hipótesis.

Métodos

La revisión bibliográfica, fue una revisión cualitativa de la literatura existente hasta el momento, en relación a las dimensiones psicóticas en población general.

La búsqueda se cerró el día dos de diciembre de 2015. Para la presente revisión sistemática realizamos una búsqueda bibliográfica en *PubMed*, *Web of Knowledge* y *Scopu.*. Los términos clave usados fueron “estudios comunitarios”, “dimensiones psicóticas”, “psicosis subclínica”, “epidemiología de la psicosis”, “población general” y “análisis de factores”. Aparte de esta búsqueda, también se realizó una búsqueda por autores más relevantes en el campo de la psicosis.

Los criterios de inclusión fueron: (a) estudios donde la edad de la muestra estuviera comprendida entre los 10 y los 60 años (b) estudios donde se usaran escalas estandarizadas para evaluar psicosis (c) investigaciones donde se incluyeran análisis de factores o análisis de componentes principales o un modelo de ecuaciones estructurales y (d) publicados en lengua inglesa. Principalmente, se excluyeron si incluían algún tipo de población clínica, diagnosticada con algún trastorno mental.

Resultados

- **Descripción de los estudios incluidos en la revisión**

Cuando analizamos los tipos de estudios encontramos una gran heterogeneidad tanto a nivel de muestra, como en el test o escala aplicados, como los análisis estadísticos utilizados.

Con respecto al tipo de muestra, la mayoría de estudios incluyeron sólo muestra adulta y en el resto el rango de edad fue más amplio, situándose entre los 11 y los 49 años. Algunas investigaciones se centraron en mujeres o incluyeron sólo estudios de gemelos o trillizos. Las muestras se obtuvieron en su mayoría de colegios, institutos y universidades, estudios epidemiológicos, en atención primaria o de estudios anteriores.

Los estudios, también aplicaron gran variedad y tipos de escalas. Un gran número de estudios aplicó el test comunitario de experiencias psicóticas (CAPE). Algunos, emplearon el cuestionario de personalidad esquizotípica (SPQ) o la entrevista estructurada de evaluación de la psicopatológica (SPIKE). Otros emplearon la lista de comprobación de síntomas 90-R o usaron el cuestionario específico de experiencias psicóticas (SPEQ), el cuestionario de Oviedo de evaluación de esquizotípia (ESQUIZO-Q) o la escala Oviedo de infrecuencia de respuesta (INF-OV).

Con respecto a los análisis estadísticos, la gran mayoría de los estudios aplicaron un análisis factorial confirmatorio o exploratorio. Algunos usaron un análisis de componentes principales o un modelo de ecuaciones estructurales o un análisis de clases latentes.

- **Dimensiones y síntomas psicóticos**

Tal y como mencionábamos en la introducción las dimensiones psicóticas están formadas por síntomas similares que suelen aparecer mas conjuntamente que de manera individual. Así, los resultados de nuestra revisión se organizan en dos niveles. El primero de ellos hace referencia a los síntomas y el segundo a las dimensiones en las que se pueden agrupar los síntomas.

- Síntomas

La Figura 1 representa la frecuencia con la que aparecen los síntomas a lo largo de los estudios.

A pesar de que los síntomas se nombren de manera distinta en los estudios, aquí los hemos agrupado en base a su descripción.

Fig 1. Representación gráfica de los síntomas encontrados en los estudios y su frecuencia.

- Dimensiones

En el segundo nivel, agrupamos los síntomas obtenidos en base a su similitud. Tradicionalmente los síntomas se han agrupado dependiendo de si implican un aumento de la actividad basal, una disminución de la actividad basal, implican un exceso de actividad motora, deterioro de las capacidades cognitivas o un componente emocional o ansiedad y un estado anímico triste, apatía o falta de deseo. Así los resultados de los estudios pueden agruparse fundamentalmente en 5 dimensiones (ver Figura 2).

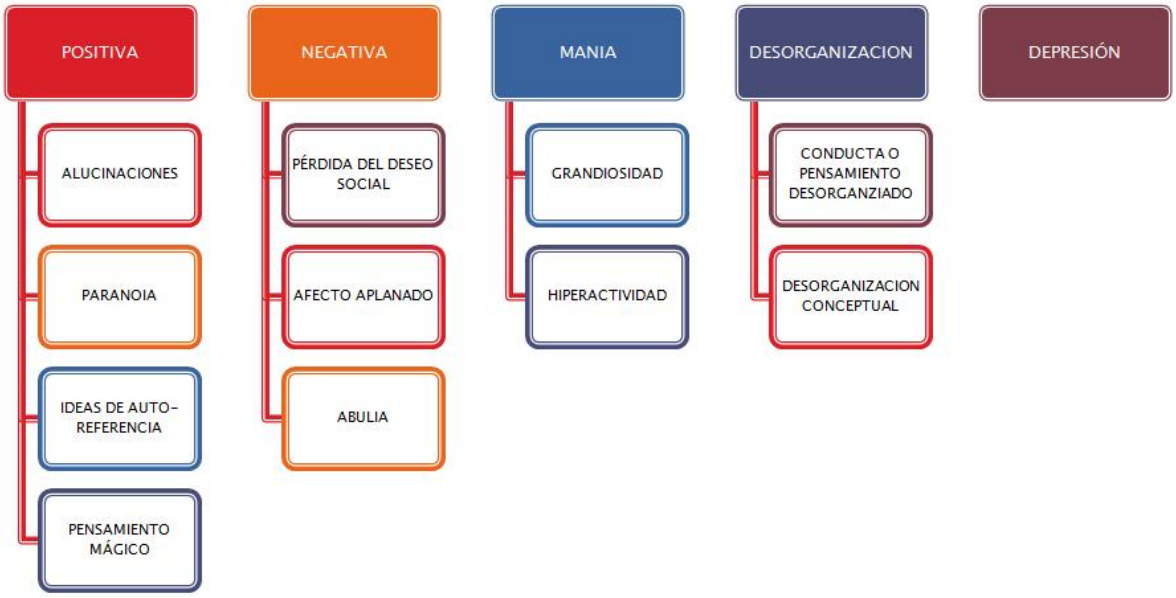


Fig 2. Agrupación de síntomas en dimensiones.

Discusión

En el presente trabajo, nos propusimos explorar el número y el tipo de dimensiones psicóticas mas estudiadas en la población general. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer intento por agrupar estudios que analizan la psicosis a nivel subclínico.

En este contexto, es importante señalar que nuestro estudio representó a las dimensiones sintomatológicas más estudiadas a nivel subclínico, no más prevalentes. Así, basándonos en los estudios analizados podemos decir que las dimensiones psicóticas más observadas son: la positiva, la negativa, la manía, la desorganización y la depresión. Nuestros resultados, evidencian que la dimensión positiva, más concretamente las alucinaciones y la paranoia, fueron más frecuentes que el factor de desorganización y la manía. Por un lado, estudios con población clínica y con población general han demostrado que la dimensión positiva es la dimensión psicótica mas validada (31). Por otro lado, la desorganización y la manía son los factores psicóticos menos replicados, tanto en grupos de pacientes como en población subclínica (32, 33). Una posible explicación a esta sobre-representación de la sintomatología positiva, es el propio interés que genera esta sintomatología. El escuchar o ver cosas que no existen, o el tener teorías conspiradoras acerca de tus vecinos, pueden ser experiencias y sensaciones mucho más disruptivas y preocupantes que el tener ideas de grandeza o algunos episodios de mucha

actividad. En esta línea, más de la mitad de los artículos revisados e incluidos en esta revisión se centraban únicamente en el análisis de la sintomatología positiva.

Estos resultados pueden tener también algunas consecuencias a nivel teórico. Tal y como comentábamos en la introducción, una de las corrientes teóricas que más apoyo está recibiendo, es aquella que defiende la existencia de un *continuum* psicótico. Donde los síntomas psicóticos serían los mismos en pacientes que en población general, sólo que en esta última, esas experiencias son menos intensas o se acompañan de menor convicción (34, 35). Esta idea del *continuum* implicaría entender la psicosis como un compendio de dimensiones, o conjuntos de síntomas. Sin embargo, aunque actualmente no existe un acuerdo de cuáles y cuantas serían las dimensiones psicóticas, uno de los modelos más replicados y más relevantes es el de los cinco factores, que incluiría la dimensión positiva, la dimensión negativa, la manía, la cognición y la depresión psicótica (37–40). En línea con esto, la presente revisión pone de manifiesto que los estudios más recientes recogen también la presencia de cinco dimensiones psicóticas, con una mayor representatividad de la dimensión positiva. Lo cual, puede interpretarse a favor de la hipótesis del *continuum*, dado que tanto en pacientes como en población general, están representadas estas cinco dimensiones sintomatológicas.

Pero, a pesar de que coinciden en la mayoría de las dimensiones, la conceptualización de algunos de los síntomas es distinta en los modelos presentados en pacientes y en los modelos en población general. La principal diferencia, se encuentra en relación a la dimensión de desorganización o dimensión cognitiva. Gran cantidad de estudios clínicos, entienden a la dimensión cognitiva como una alteración en el lenguaje, la memoria o la atención. Sin embargo, en las investigaciones en población general el factor cognitivo se entiende más bien como una desorganización en la conducta o el pensamiento, sin incluir ninguna alteración en áreas cognitivas. Quizás, esta poca representación del factor cognitivo y esta distinta conceptualización se deba a que la alteración en distintas esferas cognitivas es algo muy relacionado con el desarrollo de psicosis, por lo que esta conceptualización diferente puede deberse a la implicación de este factor sólo en pacientes con trastornos psicóticos.

A pesar de nuestro esfuerzo por superar las limitaciones encontradas, los resultados de esta revisión deben interpretarse con cautela debido a que existe

una gran heterogeneidad metodológica entre los estudios. En primer lugar, la variabilidad de test y escalas usadas para evaluar psicosis, ya que cada una de ellas mide factores o síntomas distintos. En segundo lugar, las características de la muestra de manera que algunas muestras incluían sólo mujeres, otras sólo adolescentes, otras sólo de gemelos. Lo cual dificulta generalizar o acotar los resultados.

Conclusiones

A pesar de las limitaciones metodológicas este estudio es el primero en realizar un esfuerzo por aunar la literatura existente en relación a los estudios de las dimensiones psicóticas en la población general.

Los resultados de este estudio, ponen de manifiesto la existencia de 12 síntomas psicóticos en población subclínica, agrupados en cinco dimensiones: positiva, negativa, desorganización, manía y depresión.

Al ser el modelo encontrado en esta revisión muy similar al encontrado en distintos grupos de pacientes, nuestros resultados pueden interpretarse a favor de la idea del *continuum*.

Estos datos además, pueden servir para que los profesionales clínicos que trabajan con población de riesgo, entiendan la psicosis como un fenómeno multidimensional, donde el seguimiento de cada una de las dimensiones resulta de idéntica relevancia para prever y tratar la futura enfermedad psicótica.

Bibliografía

1. Johns LC, van Os J. The continuity of psychotic experiences in the general population. Clin Psychol Rev. 2001;21(8):1125–41.

2. Raballo A, Parnas J. The silent side of the spectrum: Schizotypy and the schizotaxic self. Schizophr Bull. 2011; 37(5):1017–26.

3. Barrantes-Vidal N, Lewandowski KE, Kwapil TR. Psychopathology, social adjustment and personality correlates of schizotypy clusters in a large nonclinical sample. Schizophr Res. 2010; 122(1–3):219–25.

4. Rössler W, Riecher-Rössler A, Angst J, Murray R, Gamma A, Eich D, et al. Psychotic experiences in the general population: a twenty-year prospective community study. Schizophr Res. 2007; 92(1–3):1–14.

5. Hanssen M, Bak M, Bijl R, Vollebergh W, van Os J, Os J. The incidence and outcome of subclinical psychotic experiences in the general population. Br J Clin Psychol. 2005;

44(2):181–91.

6. Rössler W, Ajdacic-Gross V, Haker H, Rodgers S, Müller M, Hengartner MP. Subclinical psychosis syndromes in the general population: results from a large-scale epidemiological survey among residents of the canton of Zurich, Switzerland. Epidemiol Psychiatr Sci. 2015; 24(1):69–77.

7. Kaymaz N, Drukker M, Lieb R, Wittchen H-U, Werbeloff N, Weiser M, et al. Do subthreshold psychotic experiences predict clinical outcomes in unselected non-help-seeking population-based samples? A systematic review and meta-analysis, enriched with new results. Psychol Med. 2012 ;42(11):2239–53.

8. Johns LC, Cannon M, Singleton N, Murray RM, Farrell M, Brugha T, et al. Prevalence and correlates of self-reported psychotic symptoms in the British population Prevalence and correlates of self-reported psychotic symptoms in the British population. Br J Psychiatry. 2004;185(4):298–305.

9. Varghese D, Scott J, Welham J, Bor W, Najman J, O'Callaghan M, et al. Psychotic-like experiences in major depression and anxiety disorders: A population-based survey in young adults. Schizophr Bull. 2011;37(2):389–93.

10. Nishida A, Sasaki T, Nishimura Y, Tanii H, Hara N, Inoue K, et al. Psychotic-like experiences are associated with suicidal feelings and deliberate self-harm behaviors in adolescents aged 12-15 years. Acta Psychiatr Scand. 2010 ;121(4):301–7.

11. Saha S, Scott JG, Johnston AK, Slade TN, Varghese D, Carter GL, et al. The association between delusional-like experiences and suicidal thoughts and behaviour. Schizophr Res. 2011;132(2–3):197–202.

12. Allardyce J, McCreadie RG, Morrison G, van Os J. Do symptom dimensions or categorical diagnoses best discriminate between known risk factors for psychosis? Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol. 2007; 42(6):429–37.

13. Van Os J, Hanssen M, Bijl R V., Ravelli A. Strauss (1969) revisited: a psychosis continuum in the general population? Schizophr Res. 2000; 45(1–2):11–20.

14. Brett-Jones J, Garety P, Hemsley D. Measuring delusional experiences: A method and its application. Br J Clin Psychol. 1987; 26(4):257–65.

15. Eisen S V, Leff HS, Schaefer E. Implementing outcome systems: lessons from a test of the BASIS-32 and the SF-36. J Behav Health Serv Res. 1999; 26(1):18–27.

16. Peters ER, Joseph SA, Garety PA. Measurement of delusional ideation in the normal population: introducing the PDI (Peters et al. Delusions Inventory). Schizophr Bull. 1999; 25(3):553–76.

17. Haddock G, Tarrier N, Morrison AP, Hopkins R, Drake R, Lewis S. A pilot study evaluating the effectiveness of individual inpatient cognitive-behavioural therapy in early psychosis. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol. 1999; 34(5):254–8.

18. Hole RW, Rush AJ, Beck AT. A Cognitive Investigation of Schizophrenic Delusions. Psychiatry Interpers Biol Process. 1979; 42(4):321–319.

19. Jørgensen P, Jensen J. What Predicts the Persistence of Delusional Beliefs ? Psychopathology.

1994; 27(1–2):73–8.

20. Oulis PG, Mavreas VG, Mamounas JM, Stefanis CN. Formal Clinical Characteristics of Delusional Beliefs. Psychopathology. 1996; 29(4):201–8.

21. Muñoz-Negro JE, Ibanez-Casas I, de Portugal E, Ochoa S, Dolz M, Haro JM, et al. A dimensional comparison between delusional disorder, schizophrenia and schizoaffective disorder. Schizophr Res. 2015; 169(1–3):248–54.

22. Stefanovics EA, Elkis H, Zhening L, Zhang XY, Rosenheck RA. A cross-national factor analytic comparison of three models of PANSS symptoms in schizophrenia. Psychiatry Res. 2014; 219(2):283–9.

23. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders . 5 th. American Psychiatric Association, editor. Washington DC: American Psychiatric Association; 2013.

24. Linscott RJ, van Os J. Systematic Reviews of Categorical Versus Continuum Models in Psychosis: Evidence for Discontinuous Subpopulations Underlying a Psychometric Continuum. Implications for DSM-V, DSM-VI, and DSM-VII. Annu Rev Clin Psychol. 2010; 6(1):391–419.

25. Cyhlarova E, Claridge G. Development of a version of the Schizotypy Traits Questionnaire (STA) for screening children. 2005; 80:253–61.

26. Lewandowski KE, Barrantes-Vidal N, Nelson-Gray RO, Clancy C, Kepley HO, Kwapil TR. Anxiety and depression symptoms in psychometrically identified schizotypy. Schizophr Res. 2006; 83(2–3):225–35.

27. Dominguez MDG, Saka MC, Lieb R, Wittchen HU, van Os J. Early expression of negative/disorganized symptoms predicting psychotic experiences and subsequent clinical psychosis: A 10-year study. Am J Psychiatry. 2010; 167(9):1075–82.

28. Boyda D, Shevlin M, Mallett J, Murphy J, Houston J. Confirmatory factor analysis of the Schizotypal Personality Questionnaire – brief: An alternative models approach. Psychosis. 2013; 5(2):187–96.

29. Fonseca-Pedrero E, Paíno-Piñeiro M, Lemos-Giráldez S, Villazón-García U, Muñiz J. Validation of the Schizotypal Personality Questionnaire-Brief Form in adolescents. Schizophr Res. 2009; 111(1–3):53–60.

30. Fonseca-Pedrero E, Paino M, Lemos-Giráldez S, Sierra-Baigrie S, Ordóñez-Camblor N, Muñiz J. Early psychopathological features in Spanish adolescents . Psicothema. 2011; 87–93.

31. Verdoux H, Van Os J. Psychotic symptoms in non-clinical populations and the continuum of psychosis. Schizophr Res. 2002; 54(1–2):59–65.

32. Kitamura T, Okazaki Y, Fujinawa A, Yoshino M, Kasahara Y. Symptoms of psychoses. A factor-analytic study. Br J Psychiatry. 1995; 166(2):236–40.

33. Yung AR, Phillips LJ, Yuen HP, McGorry PD. Risk factors for psychosis in an ultra high-risk group: psychopathology and clinical features. Schizophr Res. 2004; 67(2–3):131–42.

34. Gruzelier JH. The Factorial Structure of Schizotypy: Part I. Affinities With Syndromes of

Schizophrenia. Schizophr Bull. 1996; 22(4):611–20.

35. Crow TJ. Sexual selection, Machiavellian intelligence, and the origins of psychosis. Lancet. 1993; 342(8871):594–8.

36. Lehoux C, Gobeil MH, Lefèbvre AA, Maziade M, Roy MA. The five-factor structure of the PANSS: A critical review of its consistency across studies. Clinical Schizophrenia and Related Psychoses. 2009; 103–10.

Capítulo 2

Relación entre el gen FTO, índice de masa corporal y depresión

Rodríguez-Hidalgo M, Agudo M, Gutierrez B,Cervilla J, Ching-López A, Molina E, Martín-Laguna MV, Ibanez-Casas I, McKenney K, Ruiz-Pérez I, Rodríguez-Barranco M, Rivera M

Resumen

La depresión y la obesidad son enfermedades altamente prevalentes y causas principales de la carga de la enfermedad y discapacidad, así como principales problemas de salud pública a nivel mundial. El gen *FTO* ha sido asociado de forma consistente en numerosos estudios con el índice de masa corporal (IMC) y la obesidad. El objetivo de este trabajo es investigar la influencia genética del polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* en el IMC en una muestra de individuos con depresión y controles representativa de la población general andaluza.

La muestra de nuestro estudio consistió en 1.181 individuos, 315 casos con diagnóstico de depresión mayor y 866 controles de los estudios GranadΣp y PISMA-ep. Se utilizaron T-tests para analizar la asociación entre la depresión y el IMC. Se aplicaron modelos de regresión lineal para rasgos cuantitativos asumiendo un modelo genético aditivo para analizar la asociación entre el polimorfismo rs9939609 y el IMC. Finalmente, se realizó un análisis de interacción entre el rs9939609, la depresión y el IMC. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software PLINK v1.06.

Se encontró que los individuos con depresión tenían valores de IMC significativamente más altos en comparación con los controles (p=0,012). El polimorfismo rs9939609 se asoció significativamente con el IMC en la muestra total (p=0,003). Al analizar los casos con depresión y los controles por separado, se encontró una asociación significativa en los controles (p=0,007). Sin embargo no se encontró ninguna evidencia de asociación en los casos (p=0,23). No hubo interacción significativa entre el genotipo y el estado de depresión en relación con el IMC (p=0,782).

Este trabajo proporciona apoyo adicional a otros estudios en los que se encuentra una asociación entre el IMC y la depresión, en una muestra representativa de la población española. Nuestros resultados muestran una asociación entre el polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* y el IMC, que también confirma hallazgos previos. Sin embargo, no encontramos que la depresión modere el efecto del gen *FTO* en el IMC.

Introducción

- **Depresión**

La depresión es el trastorno mental más frecuente y, además, una de las principales causas de discapacidad en el mundo (1). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) afecta a más de 340 millones de personas en todo el mundode los que menos del 25% tienen posibilidad de acceder a un tratamiento efectivo (2). La OMS estima que para el año 2020 la depresión será la segunda causa de discapacidad en el mundo, tan solo por detrás de las enfermedades cardiovasculares (3).

La prevalencia de esta enfermedad es variable según el país. Según el estudio ESEMed (*European Study of the Epidemiology of Mental Disorders*) en España hay una prevalencia vida del episodio depresivo de un 10,6% y una prevalencia año del 4,0%, aunque presenta una edad de inicio más temprana que en otros países y altas tasas de comorbilidad y cronicidad (4).

La depresión se presenta como un conjunto de síntomas de predominio afectivo: tristeza patológica, apatía, desesperanza, decaimiento, sensación subjetiva de malestar y cansancio, falta de autoestima, trastornos del sueño o del apetito y perdida de interés en las actividades diarias (5).

Además de afectar a los individuos que la padecen tiene un alto impacto sobre el funcionamiento social y ocupacional, así como en la salud física y en la mortalidad (6). Se han descrito en la literatura múltiples "comorbilidades" entre la depresión y una gran variedad de trastornos y enfermedades, tales como la ansiedad, distimia, rasgos neuróticos de la personalidad, distorsiones cognitivas, Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad cardíaca, diabetes tipo 1 y 2, hipo e hipertiroidismo, síndrome de Cushing,

migraña, síndrome metabólico y obesidad, entre otros. Todo esto supone un problema clínico de salud mundial cada vez más importante (4, 7).

La depresión es una enfermedad multifactorial, causada por alteraciones en diferentes sistemas, y con una elevada influencia de los factores ambientales. Cabe destacar que los factores genéticos tienen un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad. Así lo demuestran los estudios familiares y de gemelos que muestras tasas de heredabilidad que oscilan entre el 17% y el 75%, con un promedio del 37% (8). Por otra parte, los estudios de asociación genética se han centrado principalmente en neurotransmisores y genes relacionados con el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA). Casi 200 genes han sido investigados siguiendo este enfoque, aunque sólo unos pocos resultados han sido replicados. Veintiséis de estos genes candidatos para la depresión se han analizado en un meta-análisis y siete de ellos ha dado resultados significativos (*SLC6A4*, *APOE*, *DRD4*, *GNB3*, *HTR1A*, *MTHFR* y *SLC6A3*) (8). Por otro lado, los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han tenido menos éxito en depresión que en otros trastornos psiquiátricos, como la esquizofrenia y el trastorno bipolar, a la hora de encontrar evidencias sólidas de loci genéticos que contribuyen a la susceptibilidad a la enfermedad (9).

También está bien establecido que los factores genéticos actúan en combinación con factores ambientales durante toda la vida para crear una vulnerabilidad para padecer esta enfermedad. Hay pruebas consistentes de que el estrés durante la vida influye en el inicio y el curso clínico de la depresión (10). Específicamente, el estrés temprano en la vida, como las experiencias adversas durante la infancia (emocionales, físicas o sexuales), han demostrado aumentar el riesgo de depresión en la edad adulta e incluso en la vejez (11).

Dado que la depresión es responsable de una gran carga en nuestro sistema de salud y la relación que muestra con factores genéticos, se ha reconocido recientemente que la identificación de estos factores es uno de los mayores retos a los que se enfrentan los investigadores (12).

- **Obesidad**

La obesidad común es también una enfermedad compleja y multifactorial basada en la interacción entre variantes en múltiples genes de susceptibilidad y factores de riesgo ambientales. El importante aumento global de la obesidad es uno de los retos más difíciles de salud pública que debe afrontar la sociedad actual[13].La prevalencia de esta enfermedad ha aumentado rápidamente en las últimas décadas en la mayoría de los países (14). Según la OMS, más de 1.900 millones de personas (39% de la población mundial total) tenían sobrepeso en 2014, de las cuales 600 millones (13%) eran obesas. Además, este número está creciendo, y hoy en día hay en el mundo más del doble de personas obesas que hace 30 años (15).

La obesidad es un grave problema de salud pública que presenta una gran relación con la discapacidad, años de vida con deterioro del estado de salud y baja calidad de vida. Además de ser un factor de riesgo para enfermedades crónicas como la diabetes, la hipertensión, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (13, 16).

También existe una elevada evidencia de que los factores genéticos juegan un papel importante en el peso corporal y en la susceptibilidad a padecer obesidad. Los estudios de familia y gemelos estiman la heredabilidad del índice de masa corporal (IMC), la medida comúnmente utilizada para definir la obesidad, entre el 40% y el 70% (17, 18). Los estudios de genes candidatos en obesidad han descrito al menos 127 genes asociados con esta enfermedad o rasgos relacionados con la misma. De ellos, los genes más ampliamente replicados en estudios de asociación con el IMC y obesidad incluyen el *MC4R*, *BDNF*, *PCSK1,ADRB3* y el *PPARγ* (Véase Moustafa & Froguel, 2013 (19) para una revisión del tema).

Por otro lado, hasta la fecha se han realizado numerosos estudios GWAS en IMC y obesidad (20–22). El meta-análisis de estudios GWAS más grande hasta la fecha en IMC incluye 339.224 individuos y ha identificado 95 loci asociados significativamente con el IMC, 56 de los cuales eran nuevos. Vale la pena mencionar que el análisis de las vías en las que estos polimorfismos están implicados proporcionó un fuerte apoyo para un papel del sistema nervioso central en la susceptibilidad a la obesidad (20).

No hay que olvidar, que los factores ambientales también interactúan con factores genéticos aumentando el riesgo de obesidad. Se ha demostrado que los factores ambientales como el estatus social, factores culturales, el desarrollo industrial de la sociedad y los estilos de vida influyen en el desarrollo de la obesidad (23).

- **Comorbilidad depresión y obesidad**

Como ya hemos visto, ambas enfermedades son altamente prevalentes y constituyen elevados factores de riesgo para enfermedades físicas crónicas como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y la hipertensión (24, 25), además de estar asociadas con una mayor mortalidad (26).

Existe una evidencia consistente que sugiere que los individuos con depresión son más susceptibles de tener sobrepeso u obesidad (24). Asimismo, un estudio de la OMS llevado a cabo con 245.404 participantes de 60 países de todo el mundo encontró que entre el 9.3% y el 23% de los individuos afectados por una o más enfermedades físicas crónicas, padecía además depresión (25).

En un estudio realizado en Nueva Zelanda con 12.992 individuos para investigar las asociaciones entre los trastornos mentales, en particular los trastornos de ansiedad, y la obesidad en la población general, se encontró que la obesidad estaba asociada con cualquier trastorno del estado de ánimo, trastorno depresivo mayor o trastorno de ansiedad (27).

La asociación entre la depresión y la obesidad ha sido descrita en numerosos estudios, aunque su naturaleza y dirección aún no está clara. Una reciente revisión y meta-análisis de los estudios longitudinales realizados en obesidad ha puesto de manifiesto la relación bidireccional entre ambas enfermedades. En este estudio se encontró que las personas obesas tenían un 55% más de probabilidad de desarrollar depresión, y que las personas deprimidas tenían un 58% más de posibilidades de convertirse en obesos mientras están deprimidos (28).

Hay diferentes factores y mecanismos que han sido propuestos para explicar la relación y la coexistencia entre estas dos enfermedades:

En primer lugar, las personas con obesidad son más propensas a deprimirse debido a factores psicológicos como la baja autoestima, insatisfacción corporal, estigma social o patrones de alimentación (29–31).

En segundo lugar, las personas que perciben mayor estrés en su vida tienen más episodios de depresión, trastornos del sueño, reducción de la actividad física y suelen llevar un estilo de vida sedentario (28). Esta situación de ansiedad y estrés está relacionada con el consumo de alimentos de alta energía y el deseo de carbohidratos, lo que conduce a cambios hormonales y metabólicos como resistencia a la insulina, dislipemia e hipertensión (32).

En tercer lugar, tanto la depresión como la obesidad implican mecanismos fisiopatológicos comunes como la inflamación y la disfunción del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA). Existe una amplia evidencia que muestra que los niveles de Glucocorticoides (GC), (que regulan la transmisión neuronal y la plasticidad sináptica) están incrementados en la obesidad. Asimismo, en la depresión se ha observado una hiperactivación del eje HPA con un persistente aumento de los niveles de GC (32). Además, ambos trastornos pueden compartir variantes genéticas de riesgo(28, 33, 34).

En un reciente estudio se han investigado los efectos genéticos combinados de la obesidad en personas con depresión utilizando una puntuación de riesgo genético (GRS). Sus resultados mostraron que un GRS combinando 32 loci de riesgo, previamente asociado con el IMC, mejoraba la predicción de la obesidad en las personas con depresión comparado con los controles (35). Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de los efectos genéticos en la asociación entre la obesidad y la depresión.

- **El gen FTO en depresión y obesidad**

El gen *FTO* (*fat mass and obesity associated gene*) situado en el cromosoma 16 ha sido asociado de forma consistente en numerosos estudios con las formas comunes de la obesidad humana (36).

Las vías biológicas en las que está implicado el gen *FTO* permanecen en gran parte desconocidas. Los estudios en animales han puesto de manifiesto que se expresa ampliamente en el cerebro, de forma más elevada en los núcleos del hipotálamo, que están involucrados en la regulación del balance energético (37). Los estudios en humanos han encontrado que la variante de riesgo del polimorfismo rs9939609, uno de los más estudiados en el gen *FTO* hasta el momento, está asociado con unaumento del consumo energético (38, 39) y una

disminución de la sensación de saciedad[18], involucrando a este gen en la regulación del apetito.

Por tanto, sus funciones parecen relacionarse con el control hipotalámico de la saciedad, hiperfagia y ansiedad. Se ha demostrado su expresión en los núcleos cerebrales que ejercen el control de la alimentación, modificándose ante situaciones de ayuno (40).

El gen *FTO* se expresa de forma elevada en el hipotálamo y las glándulas pituitaria y adrenal mostrando un posible papel en el funcionamiento del eje HPA (41), el cual está a su vez involucrado en la regulación del peso corporal, lo que indica su posible implicación en la asociación entre la obesidad y la depresión.

En 2007, dos grupos identificaron de forma independiente un polimorfismo tipo SNP (rs9939609) en el gen *FTO* asociado con un aumento del IMC y un mayor riesgo para padecer obesidad (42, 43). Los individuos que portaban una copia de la variante de riesgo de este polimorfismo pesaban en promedio 1,2 kilos más que aquellos que no la tenían. Los que portaban dos copias de este alelo de riesgo pesaban en promedio 3 kilos más que el resto de los individuos con otras combinaciones alélicas (42).

En el mismo año, un tercer grupo a través de un estudio del genoma completo (GWAS) encontró SNPs en este gen fuertemente asociados con el IMC y rasgos relacionados con la obesidad (44). A partir de entonces, el papel del gen *FTO* en el IMC y la predisposición a la obesidad ha sido confirmado en diferentes poblaciones a través de numerosos estudios independientes (Ver Fawcett and Barroso., 2010 (45), para una revisión del tema).

La asociación entre este gen y el IMC se ha replicado en tres GWAS independientes de obesidad (21, 22, 46), y más recientemente en un meta-análisis llevado a cabo en estudios GWAS de obesidad (20), lo que apoya firmemente la existencia de una asociación entre el gen *FTO* y la obesidad.

En 2012, se llevó a cabo un estudio con dos muestras independientes de pacientes con depresión y controles, que mostró por primera vez la presencia de una interacción entre variantes comunes del gen *FTO*, la depresión y un IMC elevado. Los resultados mostraron que el efecto del gen *FTO* sobre el IMC era mayor en individuos que padecían depresión (47).

Dada la evidencia descrita en la literatura de la implicación del gen *FTO* en la obesidad, y de la asociación existente entre la depresión y la obesidad, el objetivo de este trabajo es investigar la influencia del polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* en el IMC en una muestra de individuos con depresión y controles representativa de la población general andaluza.

Material y Métodos

- **Diseño del estudio y Muestra**

La muestra de este trabajo incluye individuos procedentes de dos estudios, el GranadΣp (12) y el PISMA-ep (48). El objetivo de ambos estudios es establecer la prevalencia de los trastornos psiquiátricos mayores en Andalucía e identificar los factores de riesgo ambientales y genéticos para estas condiciones.

El GranadΣp es un estudio epidemiológico transversal basado en una muestra relativamente grande representativa de la población adulta de la provincia de Granada, Andalucía. Fue diseñado en principio como un estudio piloto independiente dentro de un estudio trasversal más extenso que abarcaría la región de Andalucía (estudio PISMA-ep).

La muestra del estudio GranadΣp incluye un total de 711 individuos de la población general que se reclutó utilizando un método de muestreo basado en la subdivisión regional de la población en rural o urbana. Se seleccionaron al azar todos los participantes con edades comprendidas entre los 18 y 80 años, a partir de la base de datos de usuarios del Sistema Andaluz de Salud (SAS), que se estima cubre el 98% de la población.

El PISMA-ep es un estudio transversal de una muestra representativa de la población andaluza (n=5.309). Su objetivo es establecer la prevalencia de los trastornos psiquiátricos mayores como esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión mayor y otras psicosis, en la población andaluza. El método de muestreo incluyó una estratificación de la región de Andalucía por provincias y la clasificación de la población en zonas rurales, intermedias o urbanas. Los individuos reclutados fueron personas con edades comprendidas entre los 18 y 75 años de ambos sexos. Todos los individuos de ambos estudios con un diagnosticado de trastorno depresivo mayor se incluyeron en este trabajo.

Los criterios de exclusión fueron muy parecidos en los dos estudios: estar fuera del rango de edad, haber vivido en Andalucía menos de un año, tener dificultades para comunicarse en español de manera fluida, estar demasiado enfermo como para poder realizar la entrevista completa, tener diagnosticado demencia o retraso mental, vivir en una institución (hospital, prisión, etc.), haberse mudado o no vivir actualmente en la dirección proporcionada por la base de datos de usuarios del SAS, y tener datos erróneos en dicha base de datos. Los participantes que se excluyeron fueron sustituidos por otros de igual edad, sexo y localización.

En ambos estudios se utilizaron los mismos métodos de evaluación. De cada participante se obtuvo información sobre: medidas clínicas, psicológicas, sociodemográficas, antropométricas, condiciones médicas, estilos de vida y otras variables ambientales, tales como acontecimientos vitales estresantes y maltrato infantil. Las personas que también aceptaron participar en el análisis genético dieron su consentimiento informado y proporcionaron una muestra biológica.

En este estudio se incluyó una muestra total de 1.181 individuos, de los estudios GranadΣp y PISMA-ep, todos ellos de ascendencia europea.

- **Medidas clínicas**

En ambos estudios, se utilizó la *Mini-International Neuropsychiatric Interview* (MINI) para determinar el diagnostico de depresión mayor. Las entrevistas fueron llevadas a cabo por psicólogos completamente entrenados para ello y se realizaron en el centro de salud o en las casas de los participantes. La MINI es una entrevista corta y estructurada que proporciona diagnósticos DSM-IV y CIE-10 de los principales trastornos mentales del Eje I (49).

- **Datos fenotípicos**

En ambos estudios, los datos del peso y la altura se obtuvieron durante la entrevista. El índice de masa corporal (IMC) se definió como el peso en kilogramos dividido entre la altura en metros al cuadrado (kg/m^2).

- **Genotipado**

De cada participante se recogió una muestra de saliva utilizando el kit de recolección de saliva de ADN de Oragene (OG-500, DNA genotekInk). El ADN se

extrajo siguiendo procedimientos estándar. Este se almacenó a -80°C y la concentración se midió por absorbancia, utilizando el lector multimodo Infinite® M200 PRO. (Tecan, ResearchTriangle Park, Carolina del Norte).

Las muestras del estudio GranadΣp fueron genotipadas utilizando el sistema de genotipadoTaqMan® OpenArrayTM (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos en bruto se analizaron con el software TaqManGenotyper v1.2 (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Se analizaron 91 polimorfismos tipo SNP y la información del polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* fue extraída para ser analizada en este trabajo. Las muestras del estudio PISMA-ep se genotiparon para el polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* usando el sistema de PCR a tiempo real TaqMan® StepOnePlusTM (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron con el software del sistema.

- **Análisis estadístico**

Se realizaron pruebas Chi^2 de Pearson para comparar la distribución de sexos, la situación laboral, el estado civil, el nivel educativo y la variación polimórfica de la variante rs9939609 del gen *FTO,* entre los casos y los controles. Adicionalmente, se realizaron T-Tests para analizar las posibles diferencias en edad e IMC entre ambos grupos. Se utilizó el software estadístico SPSS para realizar estos análisis.

El equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó en toda la muestra, y luego por separado en los casos y en los controles usando el software PLINK v1.06 (50).

Para analizar la asociación entreel polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* y el IMC se llevaron a cabo modelos de regresión lineal para rasgos cuantitativos asumiendo un modelo genético aditivo. Las covariables incluidas en el modelo fueron: el sexo, la edad, y presencia o no de depresión, cuando se analizó la muestra total.

Posteriormente se llevaron a cabo los modelos de regresión lineal por separado en casos con depresión y controles, incluyendo sexo y edad como covariables en los modelos. También se llevó a cabo la interacción entre el polimorfismo rs9939609, el IMC y la depresión. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico PLINK v1.06 (50).

Resultados

- **La muestra**

La muestra consistió en 1.181 individuos, 315 casos con un diagnóstico de depresión mayor y 866 controles. Entre los casos, 33,65% (106) eran hombres y 66,8% (209) mujeres, mientras que en la muestra de controles, el 54,85% (475) eran hombres y el 45,15% (391) mujeres. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de sexos entre casos y controles, con un exceso de mujeres en el grupo de casos ($\chi 2$ =41,532, p <0,001).

También se encontraron diferencias significativascon respecto al estado civil ($\chi 2$ =49,14, p <0,001) y la situación laboral ($\chi 2$ =76,88, p <0,001). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en relación al nivel educativo o la edad media. En la Tabla 1 se muestra el perfil sociodemográfico de la muestra.

- **Asociación entre el IMC y la depresión mayor**

En nuestra muestra, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el IMC y la depresión. Los individuos con depresión presentaban valores de IMC significativamente más altos en comparación con los controles (casos:IMC = 27,49 (DE = 5,65); controles IMC=26,69 (DE=4.41), t=-2,52, p=0,012).

- **Asociación entre el polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* y la depresión mayor**

Las frecuencias genotípicas se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg en la muestra total, en casos y en controles (p>0,001). No se encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas ($\chi 2$ =0,06, p=0,8) o genotípicas ($\chi 2$ =0,07, p=0,97) cuando se compararon los casos con depresión y los controles (ver Tabla 2 para una descripción más detallada de las frecuencias alélicas y genotípicas en ambos grupos).

Tabla 1: Perfil sociodemográfico de la muestra

		Casos		Controles	
		N	%	N	%
Depresión mayor		315	26,67	866	73,33
Edad (Desviación estándar)		48,22 (15,39)		53,43 (16,03)	
IMC kg/m² (Desviación estándar)		27,49 (5,65)		26,69 (4,41)	
Sexo	Hombre	106	33,7	475	54,8
	Mujer	209	66,3	391	45,2
Estado Civil	Soltero	64	20,3	110	12,7
	Casado	175	55,6	648	74,8
	Separado	20	6,3	28	3,2
	Divorciado	27	8,6	22	2,5
	Viudo/a	29	9,2	58	6,7
Nivel de estudios	Analfabeto	12	3,8	26	3
	Sabe leer y escribir, pero no tiene estudios	74	23,5	136	18
	Primaria	127	40,3	337	38,9
	Secundaria	61	19,4	199	23
	Diplomado	26	8,3	66	7,6
	Licenciado	14	4,4	72	8,3
	Doctorado	1	0,3	10	1,2
Situación de trabajo	Contratado/ Autónomo	79	25,1	319	36,8
	Paro/Buscando empleo	100	31,7	141	16,3
	Jubilado	43	13,7	248	28,6
	Incapacitado	19	6	18	2,1
	Cuidador familiar	60	19	106	12,2
	Estudiante	14	4,4	34	3,9

Tabla 2: Frecuencias alélicas genotípicas del polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* en casos con depresión y controles

Frecuencias alélicas	Casos	Controles
A	259 (26,4%)	722(73,6%)
T	371(26,9%)	1.010(73,1%)
χ^2=0,06, df=1, p=0,8		
Frecuencias genotípicas	**Casos**	**Controles**
A/A	49 (26,2%)	138(73,8%)
A/T	161(26,5%)	446(73,5%)
T/T	105(27,1%)	282(72,9%)
χ^2=0,07, df= 2, p=0,97		

- **Asociación entre el polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* y el IMC**

En la muestra total, tras incluir las covariables sexo, edad y estado de depresión en el modelo de regresión lineal, se encontró una asociación significativa entre el polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* y el IMC (β =0,567, p =0,003).

Al analizar los casos con depresión y los controles por separado, se encontró una asociación significativa entre el polimorfismo rs9939609 y el IMC en los controles (β =0,561, p=0,007). Sin embargo no se encontró ninguna evidencia de asociación en los casos (β =0,53, P = 0,23).

- **Interacción entre el polimorfismo del *FTO* y la depresión mayor sobre el IMC**

No se encontró una interacción significativa entre el genotipo y la depresión en relación al IMC (β =-0,125, p=0,782). Es decir, no se observó que el polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* modifique la asociación entre la depresión y un aumento de las puntuaciones del IMC (Figura 1).

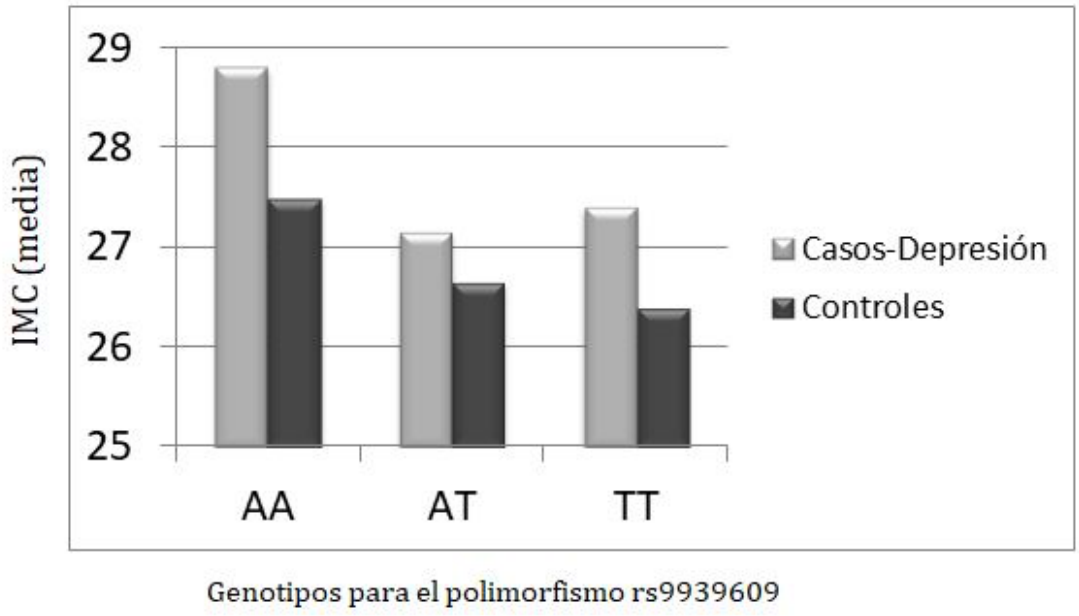


Fig 1. IMC en casos con depresión y controles de acuerdo con el genotipo delgen *FTO*

Discusión

En este trabajo, hemos investigado la influencia del polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* en el IMC en una muestra de individuos con depresión y controles procedentes de la población general andaluza.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el IMC entre los casos con depresión y los controles, siendo mayor éste en los individuos con depresión. Estos resultados coinciden con los reportados en estudios previos (27,47). El hecho de que las personas con depresión tengan un mayor IMC que los controles podría deberse a diferentes razones, incluyendo los efectos secundarios del tratamiento antidepresivo, un estilo de vida sedentario o un aumento de la ingesta de alimentos. No hay que olvidar que las causas genéticas también pueden contribuir a la comorbilidad entre la depresión y la obesidad (33).

Los resultados de este trabajo proporcionan un apoyo adicional a la asociación previamente descrita en numerosos estudios entre el polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* y el IMC. En 2007, dos grupos identificaron de forma independiente el polimorfismo tipo SNP (rs9939609) del gen *FTO* asociado con un aumento del IMC y un mayor riesgo para padecer obesidad (42, 43). El mismo año en un estudio GWAS también se encontró este polimorfismo fuertemente asociado con el IMC y rasgos relacionados con la obesidad (44). Posteriormente, se realizaron tres estudios GWAS de obesidad que confirmaron la asociación entre este polimorfismo

y el IMC (21, 22, 46). Y más recientemente se ha encontrado este polimorfismo asociado con obesidad en un meta-análisis llevado a cabo en estudios GWAS de obesidad (20).

Un hallazgo nuevo en este estudio es que la asociación encontrada entre el polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* y el IMC en la muestra total, se debe principalmente al grupo de controles, ya que no se encontró asociación en el grupo de casos con depresión. Al contrario de lo que se observaba en el estudio de Rivera et al. (47), en el que la asociación se debía principalmente al grupo de individuos con depresión. Esto puede ser debido probablemente al bajo tamaño muestral del grupo de casos con depresión en nuestro estudio.

Tampoco se encontró una interacción significativa entre el genotipo y la depresión en relación al IMC, al contrario de los resultados descritos en el estudio de Rivera et al (47).

Este estudio tiene ciertamente algunas limitaciones que merecen ser mencionadas. Una de las limitaciones del estudio es el relativamente pequeño tamaño de la muestra. En un estudio previo con un tamaño muestral más grande (3.734 casos de depresión y 2.499 controles) llegaron a otra conclusión tras investigar la relación entre el polimorfismo rs9939609, el IMC y la depresión. Los investigadores encontraron una interacción entre varios polimorfismos del gen *FTO,* incluido el rs9939609, el IMC y depresión mayor. El efecto de las variantes del gen *FTO* sobre el IMC era mayor en aquellos sujetos con depresión (47). Otra limitación de este estudio es que las medidas de altura y peso que se utilizaron para calcular el IMC eran autoreportadas. Sin embargo, en el estudio mencionado anteriormente que incluía una muestra original y una muestra de replicación, la altura y el peso se midieron directamente sólo en la muestra de replicación y se encontró el mismo patrón de resultados que en la muestra original.

En este trabajo hemos seguido la misma metodología que en el trabajo de Rivera et al (47). Nuestros resultados muestran una asociación entre el IMC y la depresión que confirma los resultados de este estudio y estudios previos. Además encontramos una asociación entre el polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* y el IMC, que también confirma hallazgos de estudios previos. Sin embargo, no encontramos que la depresión modere el efecto del gen *FTO* en el IMC.

El hecho de que los casos con depresión tuvieran un IMC medio significativamente más alto que los controles apoya la visión de que la depresión tiene una tendencia a asociarse con un IMC elevado.

Dada la alta prevalencia de estas dos enfermedades y la relevancia de explorar la relación genética entre la obesidad y la depresión y superar el problema del insuficiente tamaño muestral, estamos trabajando en el genotipado del resto de las muestras que constituyen toda la población objetivo del estudio PISMA-ep. Se necesitarán, por tanto, estudios futuros con tamaños de muestra mayores y meta-análisis para aclarar el papel de este polimorfismo en la relación entre el IMC o la obesidad y la depresión.

El uso de la genética será cada vez más habitual en la próxima era de la medicina personalizada. El uso de la misma y de estrategias estadísticas novedosas nos puede ayudar a desenredar la comorbilidad observada entre estas dos enfermedades, así como mejorar nuestra comprensión de la arquitectura genética común, proporcionando un potencial real para las intervenciones y tratamientos personalizados.

Bibliografía

1. World Health Organization. (2017). Depression and other common mental disorders: global health estimates. World Health Organization, 1–24.

2. Schnaas F. (2017). Avances en el diagnóstico y tratamiento de la ansiedad y la depresión. Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría, 45(1), 22–25.

3. Whiteford HA, Ferrari AJ, Degenhardt L, Feigin V, Vos T. (2015). The Global Burden of Mental, Neurological and Substance Use Disorders: An Analysis from the Global Burden of Disease Study 2010. PLOS ONE, 10(2), e0116820.

4. Álvarez Ariza M, Atienza Merino G, Ávila González M, González García A, Guitián Rodríguez D, De las Heras E, … Triñanes Y. (2014). Guía de práctica clínica sobre el manejo de la depresión en el adulto. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 21–223.

5. Paykel ES. (2008). Basic concepts of depression. Dialogues in clinical neuroscience, 10(3), 279–89.

6. National Collaborating Centre for Mental Health (Great Britain), & Royal College of Psychiatrists. (2010). Depression : the treatment and management of depression in adults. Royal College of Psychiatrists.

7. Maes M, Kubera M, Obuchowiczwa E, Goehler L, Brzeszcz J. (2011). Depression's multiple comorbidities explained by (neuro)inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. Neuroendocrinol Lett Neuroendocrinology Letters, 32(1), 7–24.

8. Flint J, Kendler KS. (2014). The Genetics of Major Depression. Neuron. 81(3), 484–503.

9. Ripke S, Wray NR, Lewis CM, Hamilton SP, Weissman M M, Breen G, … Sullivan PF. (2013). A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. Molecular Psychiatry, 18(4), 497–511.

10. Brown GW, Harris T. (1978). Social origins of depression: a reply. Psychological medicine, 8(4), 577–88.

11. Shapero BG, Black SK, Liu RT, Klugman J, Bender RE, Abramson LY, Alloy LB. (2014). Stressful Life Events and Depression Symptoms: The Effect of Childhood Emotional Abuse on Stress Reactivity. Journal of Clinical Psychology, 70(3), 209–223.

12. Ching-López A, Cervilla J, Rivera M, Molina E, McKenney K, Ruiz-Perez I, … Gutiérrez 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, 2743–54.

13. Aranceta-Bartrina J, Pérez-Rodrigo C, Alberdi-Aresti G, Ramos-Carrera N, Lázaro-Masedo S. (2016). Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población adulta española (25–64 años) 2014–2015: estudio ENPE. Revista Española de Cardiología, 69(6), 579–587.

14. Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. (2011). Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. The Lancet, 378(9793), 815–825.

15. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). (2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. Lancet (London, England), 387(10026), 1377–1396.

16. Uribarri J, Cai W, Woodward M, Tripp E, Goldberg L, Pyzik R, … Vlassara H. (2015). Elevated Serum Advanced Glycation Endproducts in Obese Indicate Risk for the Metabolic Syndrome: A Link Between Healthy and Unhealthy Obesity? The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 100(5), 1957–1966.

17. Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. (1990). The Body-Mass Index of Twins Who Have Been Reared Apart. New England Journal of Medicine, 322(21), 1483–1487.

18. Wardle J, Carnell S, Haworth CMA, Farooqi IS, O'Rahilly S, Plomin R. (2008). Obesity Associated Genetic Variation in FTO Is Associated with Diminished Satiety. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 93(9), 3640–3643.

19. El-Sayed Moustafa JS, Froguel P. (2013). From obesity genetics to the future of personalized obesity therapy. Nature Reviews Endocrinology, 9(7), 402–413.

20. Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR., … Speliotes EK. (2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. Nature, 518(7538), 197–206.

21. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, … Loos RJF. (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. Nature Genetics, 42(11), 937–948.

22. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadottir A, … Stefansson K. (2009). Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. Nature Genetics, 41(1), 18–24.

23. Kopelman PG. (2000). Obesity as a medical problem. Nature, 404(6778), 635–643.

24. Farmer A, Korszun A, Owen MJ, 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.

25. Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, Tandon A, Patel V, Ustun B. (2007). Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. Lancet (London, England), 370(9590), 851–8.

26. Zhang C, Rexrode KM, van Dam RM, Li TY, Hu FB. (2008). Abdominal Obesity and the Risk of All-Cause, Cardiovascular, and Cancer Mortality: Sixteen Years of Follow-Up in US Women. Circulation, 117(13), 1658–1667.

27. Scott KM, McGee MA, Wells JE, Oakley Browne MA. (2008). Obesity and mental disorders in the adult general population. Journal of psychosomatic research, 64(1), 97–105.

28. Luppino FS, de Wit LM, Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, Penninx BWJH, Zitman FG. (2010). Overweight, Obesity, and Depression. Archives of General Psychiatry, 67(3), 220.

29. Askari J, Hassanbeigi A, Khosravi HM, Malek M, Hassanbeigi D, Pourmovahed Z, Alagheband M. (2013). The Relationship Between Obesity and Depression. Procedia - Social and Behavioral Sciences, 84, 796–800.

30. Carpenter KM, Hasin DS, Allison DB, Faith MS. (2000). Relationships between obesity and DSM-IV major depressive disorder, suicide ideation, and suicide attempts: results from a general population study. American journal of public health, 90(2), 251–7.

31. Stunkard A J, Faith M S, Allison KC. (2003). Depression and obesity. Biological psychiatry, 54(3), 330–7.

32. Schweinfurth N, Walter M, Borgwardt S, Lang UE. (2016). Depression and Obesity. In Obesity (pp. 235–244). Cham: Springer International Publishing.

33. 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.

34. Penninx B W, Milaneschi Y, Lamers F, Vogelzangs N. (2013). Understanding the somatic consequences of depression: biological mechanisms and the role of depression symptom profile. BMC Medicine, 11(1), 129.

35. Hung C-F, Breen G, Czamara D, Corre T, Wolf C, Kloiber S, … Rivera M. (2015). A genetic risk score combining 32 SNPs is associated with body mass index and improves obesity prediction in people with major depressive disorder. BMC Medicine, 13(1), 86.

36. Loos R J F, Bouchard C. (2008). FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. Obesity Reviews, 9(3), 246–250.

37. Gerken T, Girard C A, Tung Y-C L, Webby C J, Saudek V, Hewitson K S, … Schofield C J. (2007). The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate-Dependent Nucleic Acid Demethylase. Science, 318(5855), 1469–1472.

38. Cecil J E, Tavendale R, Watt P, Hetherington M M, Palmer C N A. (2008). An Obesity-Associated FTO Gene Variant and Increased Energy Intake in Children. New England Journal of Medicine, 359(24), 2558–2566.

39. Wardle J, Llewellyn C, Sanderson S, Plomin R. (2009). The FTO gene and measured food intake in children. International Journal of Obesity, 33(1), 42–45.

40. Rodríguez-López R, González-Carpio M, Serrano MV, Torres G, García de Cáceres M T, Herrera T, … Luengo L M. (2010). Asociación de polimorfismos en el gen FTO con la obesidad mórbida en la población extremeña. Endocrinología y Nutrición, 57(5), 203–209.

41. Su A I, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching K A, Block D, … Hogenesch J B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(16), 6062–6067.

42. Frayling T M, Timpson N J, Weedon M N, Zeggini E, Freathy R M, Lindgren C M, … McCarthy M I. (2007). A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. Science, 316(5826), 889–894.

43. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, … Froguel P. (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. Nature Genetics, 39(6), 724–726.

44. Scuteri A, Sanna S, Chen W-M, Uda M, Albai G, Strait J., … Abecasis G R. (2007). Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. PLoS Genetics, 3(7), e115.

45. Fawcett KA, Barroso I. (2010). The genetics of obesity: FTO leads the way. Trends in Genetics, 26(6), 266–274.

46. Willer C J, Speliotes E K, Loos R J F, Li S, Lindgren C M, Heid I M, … (2009). Genetic Investigation of ANthropometric Traits Consortium.. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. Nature Genetics, 41(1), 25–34.

47. Rivera M, Cohen-Woods S, Kapur K, Breen G, Ng M Y, Butler A W, … McGuffin P. (2012). Depressive disorder moderates the effect of the FTO gene on body mass index. Molecular Psychiatry, 17(6), 604–611.

48. Cervilla J A, Ruiz I, Rodríguez-Barranco M, Rivera M, Ibáñez-Casas I, Molina E, … Gutiérrez B. (2016). Protocolo y metodología del estudio epidemiológico de la salud mental en Andalucía: PISMA-ep. Revista de Psiquiatría y Salud Mental, 9(4), 185–194.

49. Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, … Dunbar GC. (1998). The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. The Journal of clinical psychiatry, 59 Suppl 20, 22-33;quiz 34-57.

50. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, … Sham PC. (2007). PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. The

American Journal of Human Genetics, 81(3), 559–575.

Capítulo 3

Migraña episódica y crónica: aspectos terapéuticos y psicosociales

Lagoa-Maya S, García-Leiva JM, Gómez Camello A, Calandre EP.

Resumen

Introducción: La migraña es una enfermedad que causa un fuerte impacto en los pacientes que la padecen. La migraña crónica (MC) es una complicación de la migraña (>14 episodios/mes), estimándose que ejerce un impacto superior al de la migraña episódica (ME) en el sujeto que la sufre.

Objetivo: Comparar un grupo de pacientes con ME con un grupo de pacientes con MC en lo referente a aspectos terapéuticos y repercusiones en la calidad de vida de los sujetos.

Material y métodos: Se administró una encuesta, recogiéndose datos sociodemográficos y terapéuticos, así como los siguientes cuestionarios: impacto de las cefaleas sobre la calidad de vida (HIT-6), insomnio (ISI), depresión (BDI), sensación de ser una carga y pertenencia frustrada al grupo (INQ). Los datos obtenidos se analizaron mediante las pruebas de *t de Student, Chi*^{2} o *test de Fisher* en función de que fueran paramétricos o no paramétricos.

Resultados: Respondieron a la encuesta 30 pacientes con ME y 22 con MC. Se observó que recibían tratamiento preventivo en mayor proporción los pacientes con MC (77,27%, n=17 frente al 30%, n=9 en ME; p=0,0017). Además, se apreciaron diferencias en cuanto al tipo de fármaco prescrito en cada grupo. El impacto de la cefalea sobre la vida del paciente fue superior en MC, poniéndose de manifiesto principalmente en el HIT-6 (p=0,0132). Aunque las puntuaciones del grupo MC fueron también superiores en los demás cuestionarios, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Conclusiones: Un mayor número de pacientes con MC recibieron tratamiento preventivo, siendo los más frecuentes la toxina botulínica y el topiramato. Además,

se observaron puntuaciones más altas en los cuestionarios del grupo de MC frente al de ME, lo que se traduce en un impacto superior sobre la calidad de vida de estos sujetos, evidenciándose en las diferencias estadísticamente significativas del cuestionario HIT-6.

Palabras clave: Migraña, migraña crónica, tratamiento preventivo, impacto, encuesta.

Introducción

La migraña es un trastorno neurológico común y altamente discapacitante que afecta al 12-15% de la población mundial (1). Cursa con crisis de cefalea, con una duración entre 4 y 72 horas, habitualmente de localización hemicraneal y, con frecuencia, agravada por la actividad física (2).

Según su frecuencia de presentación, la migraña puede subdividirse en dos tipos: la migraña episódica (ME), que cumple los criterios anteriormente descritos, y se presenta con una frecuencia inferior a 15 días al mes y la migraña crónica (MC) que se presenta 15 o más días al mes durante más de 3 meses (2, 3).

La migraña es considerada por la OMS como la sexta causa de años de vida perdidos por discapacidad, debido a los numerosos aspectos de la vida diaria que quedan afectados en estos pacientes (4). Además, se relaciona estrechamente con la presencia de comorbilidad psiquiátrica como depresión, ansiedad e ideación suicida. Esta asociación se considera bidireccional, ya que se ha observado un riesgo tres veces mayor en pacientes con migraña de desarrollar depresión y trastornos de ataque de pánico y, a su vez, estas patologías se relacionan con un mayor riesgo de padecer migraña (5). También se constata una relación entre las cefaleas y el aumento de riesgo de padecer trastornos del sueño con respecto a la población general. En el caso que nos compete, los pacientes con ME presentan trastornos del sueño con una frecuencia 5 veces mayor que la población libre de cefaleas, asociación que es mucho más fuerte en pacientes con MC (6-7).

Así mismo, se conoce que la migraña no solo produce dolor, sino que implica además problemas sociales (impide, en ocasiones, que los pacientes pueden mantener su relación social y familiar con normalidad), laborales (debido al aumento de las bajas, ausentismo escolar y laboral, etc.) y emocionales que producen un importante impacto sobre la calidad de vida de estos pacientes (8, 9).

En el caso de la MC, toda esta sintomatología y comorbilidad referidas se ven agravadas en relación al mayor número de días con cefalea.

El objetivo de nuestro estudio fue analizar diversos aspectos psicosociales y terapéuticos en pacientes con ME y MC y realizar una comparación entre ambos grupos, con el fin de objetivar las diferencias existentes en cuanto al tratamiento preventivo y la calidad de vida de dichos pacientes.

Material y Métodos

- **Diseño del estudio**

Se realizó un estudio transversal de tipo descriptivo utilizando una encuesta auto-administrada por Internet como herramienta para la valoración de los sujetos de estudio. Tras proponerles la participación a aquellos pacientes seleccionados, se les envió la encuesta a través de correo electrónico. Podemos encontrar la misma en el siguiente enlace: https://goo.gl/forms/JFoZqx62oqL6Zugj2.

Los criterios de inclusión en el estudio fueron padecer algún tipo de cefalea, ser mayores de edad y prestar su consentimiento, de manera voluntaria, para participar en el estudio. No se establecieron criterios de exclusión por no considerarlos necesarios respecto al objetivo de la encuesta. Del total de participantes, se seleccionaron aquellos que padecían ME y MC con el fin de evaluar la diferencia existente entre ambos grupos en cuanto a aspectos terapéuticos y psicosociales.

Con el fin de obtener datos tanto de la población general como procedentes de atención terciara, los pacientes fueron reclutados en la consulta de cefaleas del Hospital Campus de la Salud (Granada) y a través de una oficina de farmacia.

En primer lugar, la encuesta recogió una batería de preguntas sobre aspectos sociodemográficos, tales como edad, sexo, comunidad autónoma en la que reside, estado civil, nivel de estudios y actividad actual. A continuación se recogieron datos clínicos de relevancia en el estudio, así como el tipo de cefalea sufrida, quién realizó el diagnóstico de su cefalea, desde cuándo está diagnosticado y si padece alguna otra enfermedad. Posteriormente, en la encuesta aparecían una serie de cuestiones relacionadas con el tratamiento farmacológico preventivo (si se encuentra actualmente en tratamiento para la cefalea, qué tipo de fármaco le prescribieron, y qué profesional realizó dicha prescripción). En último lugar, se

plantearon la siguiente serie de cuestionarios, cada uno de ellos destinado a evaluar un aspecto psicosocial potencialmente afectado, en mayor o menor medida, por cada tipo de cefalea:

I. La **Escala de Impacto de la cefalea sobre la calidad de vida** (**HIT-6**, por sus siglas en inglés): es una herramienta utilizada para medir el impacto en la capacidad de funcionar en el trabajo, en casa o en las situaciones sociales de las personas que sufren cefaleas. Consta de 6 preguntas que se responden con Nunca (6 puntos), Pocas veces (8 puntos), A veces (10 puntos), Muy a menudo (11 puntos) o Siempre (13 puntos). La suma de los valores de las 6 respuestas proporcionará un resultado que nos permite clasificar el nivel de impacto en: poco o ningún impacto (<49 puntos), cierto impacto (50-55 puntos), impacto importante (56-59 puntos) e impacto muy severo (>60 puntos) (10, 11).

II. El **Índice de Gravedad del Insomnio** (**ISI**, por sus siglas en inglés) evalúa, mediante 7 ítems, el insomnio en la población general siguiendo los criterios del *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, 4 ed.* (DSM-IV). Cada pregunta tiene cinco posibles respuestas, con una puntuación de 0 a 4. El resultado del test se obtiene sumando las 5 puntuaciones de modo que, a mayor puntuación, peor calidad del sueño en un rango de 0 a 28 puntos (12, 13).

III. El **Inventario para la Depresión de Beck-II** (**BDI-II**, por sus siglas en inglés) es un instrumento para la valoración de la depresión, tanto en población normal como en aquella con problemas psicológicos. Este cuestionario cuenta con un total de 21 ítems con cuatro posibles respuestas, cuya puntuación oscila entre 0 y 3. La suma de estas puntuaciones nos dará un valor que clasifica a los pacientes en 4 grados de depresión: mínima (0-13), leve (14-19), moderada (20-28) y grave (29-63) (14, 15).

IV. Una versión de 12 ítems del **Cuestionario de Necesidades Interpersonales** (**INQ**, por sus siglas en inglés); este se compone de dos partes, una que evalúa en qué medida la persona se siente una carga para su entorno y otra que valora la sensación frustrada de pertenencia al grupo,

ambas variables relacionadas estrechamente con la ideación suicida. Este test cuenta con 7 y 5 preguntas respectivamente, con una puntuación que va de 1 (no es cierto para mí) a 7 (totalmente cierto para mí). De los 12 ítems, 7 suman la puntuación marcada y los otros 5 suman la inversa (es decir, si el paciente marcó un 2, sumará 6 puntos). Ambos apartados se evalúan por separado y sus puntuaciones oscilan entre 7 y 49 en la variable de sentirse una carga y de 7 a 35 en la variable pertenencia frustrada (16, 17).

- **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 6.

Se compararon los resultados de cada cuestionario entre el grupo de ME y el de MC y la edad de los sujetos mediante *t de Student*. L comparación entre ambos grupos de las variables no paramétricas se realizó a través del test de Chi^2 o el *test de Fisher*. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p<0.05$. Se evaluó el efecto de cada patología sobre la vida de estos pacientes, así como la necesidad de tratamiento farmacológico preventivo de cada uno de los grupos.

Resultados

Se incluyeron un total de 52 pacientes, 30 de ellos diagnosticados de ME y 22 de MC. De la encuesta, se extrajeron los siguientes resultados clínicos y sociodemográficos de ambos grupos que se exponen en la Tabla 1:

Tabla 1: Datos clínicos y sociodemográficos

	ME	**MC**	**P**
Edad años (media ± d. e.)	20-57 35,1 ± 10,9	22-72 41,5 ± 14,6	0,0609
Sexo (% mujeres)	77	91	0,1798
Estado civil (% casados o en pareja)	36,7	50	0,3363

Nivel de estudios (% secundarios/ universitarios)	93,3	86,4	0,3996
Diagnóstico por neurólogo (%)[a]	53,3	86,4	**0,0121***
Años de diagnóstico (%/años)	10% < 1 26,7% entre 1-5 63,3% > 5	0% < 1 36,4% 1-5 63,6% > 5	0,2742
Con tratamiento preventivo (%)	30	77,3	**0,0017***

a. Resto de diagnósticos realizados por Médicos de Atención Primaria u otros especialistas
* Se señalan en negrita los resultados estadísticamente significativos

Como se puede observar, la media de edad en el grupo de MC es de casi 6 años superior al de ME. En cuanto al sexo, en ambos grupos predomina el femenino, acentuándose aún más en el de MC. Con respecto al estado civil, se aprecia un ligero aumento de personas solteras en el grupo de ME. Además, el nivel de estudios predominante en ambos casos es de estudios secundarios o universitarios.

En cuanto a los parámetros clínicos, aproximadamente en la misma proporción en ambos grupos, recibieron el diagnóstico hace más de 5 años, mientras que en el grupo de ME aparece un pequeño porcentaje de pacientes que fueron diagnosticados hace menos de 1 año, siendo inexistente esta categoría en el grupo de MC. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al médico que realizó el diagnóstico (p=0,0121), siendo el neurólogo el que realiza el diagnóstico de MC con mucha más frecuencia. Con respecto a la variable de estudio *encontrarse actualmente en tratamiento preventivo*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p=0,0017), siendo muy superior el porcentaje de pacientes en tratamiento en el grupo de MC. Los fármacos preventivos prescritos se detallan en la Tabla 2:

Tabla 2: Distribución de tratamientos preventivos

Tratamientos	Pacientes ME n (%)	Pacientes MC n (%)
Sin tratamiento	21 (70)	5 (22,73)
Topiramato	3 (10)	6 (27,27)
Betabloqueantes	1 (3,33)	4 (18,18)
Amitriptilina	1 (3,33)	4 (18,18)
Toxina Botulínica	0	8 (36,36)
Otros	4 (13,33)	4 (18,18)

En nuestra muestra, el fármaco más utilizado en ME fue el topiramato, mientras que en el grupo de MC predominó el uso de toxina botulínica de tipo A además del topiramato. Las diferencias entre ambos grupos para esta variable fueron estadísticamente significativas (p=0,0004).

En último lugar, los resultados de los cuestionarios, así como su análisis estadístico, se muestran en la tabla 3:

Tabla 3: Resultados de los cuestionarios

Cuestionario	ME (n=30)	MC (n=22)	P
HIT-6	(46-72) 60,9 ± 1,2	(46-78) 66,6 ± 2,0	**0,0132***
BDI-II	(2-51) 15,5 ± 2,4	(0-52) 22,3 ± 3,5	0,1052
ISI	(0-27) 11,4 ± 1,3	(0-28) 13,7 ± 1,8	0,2961
INQ (Carga)	(7-48) 13,9 ± 1,9	(7-44) 20,1 ± 2,5	0,0533
INQ (Pertenencia)	(5-36) 13,6 ± 1,3	(5-31) 17,7 ± 1,4	**0,0434***

* Se señalan en negrita los resultados estadísticamente significativos.

Como se aprecia en la tabla 3, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en HIT-6, mostrando un mayor un impacto de las cefaleas sobre la calidad de vida en el grupo de MC y en el cuestionario INQ, en el apartado correspondiente a sensación de pertenencia frustrada al grupo, siendo también esta superior en los pacientes con MC. En el resto de cuestionarios existe una

tendencia al alza del grupo de MC, aunque las diferencias entre ambos no llegaron a ser significativas.

Discusión

Los resultados del presente estudio coinciden en cuanto a la media de edad con los estudios de revisión de Carod-Artal et al en 2012, que sitúan entre 30 y 40 años el pico de máxima prevalencia de la ME y entre los 40 y 50 años en el caso de la MC(3). Respecto a la proporción de mujeres con migraña, el resultado obtenido en nuestro estudio (4,8:1) coincide con los de los estudios epidemiológicos sobre esta enfermedad (1). Por el contrario, nuestro estudio contó con un mayor número de pacientes con estudios secundarios o universitarios, a diferencia de los datos que presentan los investigadores anteriormente mencionados de la influencia de un nivel educativo bajo sobre la presencia de migraña (3). Esto puede deberse al método utilizado para la participación en nuestro estudio, el cual requiere unos mínimos conocimientos informáticos y capacidad de acceso a Internet.

En cuanto al tratamiento preventivo de la migraña, encontramos que en nuestra muestra el 77,3% de pacientes con MC estaban siendo tratados con algún tipo de fármaco, aunque las recomendaciones para este tipo de migraña indican que debería ser del 100%, por sus características definitorias (18). En el grupo ME el 30% de nuestros pacientes recibían tratamiento preventivo; dado que se estima que en esta patología, el 25% precisarán tratamiento preventivo, consideramos que están siendo adecuadamente tratados, a diferencia del grupo de MC (19, 20).

En lo referente a tratamiento farmacológico, aunque el tratamiento sintomático indicado es el mismo en ambas patologías, difiere cuando se trata del tratamiento preventivo (21). Se aprecia que nuestra muestra de pacientes con ME reciben los tratamientos recomendados por la guía oficial de práctica clínica en cefaleas de la Sociedad Española de Neurología (18). En cuanto al grupo de MC, los fármacos más utilizados en nuestra muestra son el topiramato y la toxina botulínica, coincidiendo con estudios que demuestran su eficacia en esta patología (22-25), y con las recomendaciones de diversas guías de práctica clínica (18, 26, 27). Una proporción inferior de nuestro grupo estaba siendo tratada con betabloqueantes, amitriptilina y otros fármacos que, aunque con menor nivel de evidencia científica, también se consideran recomendables (28).

Como era de esperar, los resultados del cuestionario HIT-6 fueron estadísticamente significativos entre ambos grupos, presentando una diferencia media de 5,7 puntos entre ambos y señalando un impacto de las cefaleas sobre la calidad de vida mayor en pacientes con MC. Aun así, la puntuación media del cuestionario en el grupo de ME indica que estos pacientes también sufren un impacto muy severo sobre la calidad de vida, por lo que podemos afirmar que en ambos casos, la calidad de vida de los pacientes se ve afectada. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en el estudio de Adams et al (29), donde se evaluó la discapacidad sufrida por pacientes con ME y MC mediante el uso del cuestionario MIDAS; este estudio contó con una muestra de sujetos de N=15.313 en el caso de la ME y de N=1.476 en el caso de la MC. La media de puntuación del MIDAS fue de 13,1 y 60,5 respectivamente, objetivándose una mayor discapacidad en el grupo de MC ($p<0,001$).

En lo referente a depresión se midió la relación de ésta con la migraña a través del cuestionario BDI-II. Aunque las diferencias entre ambos grupos no llegaron a ser estadísticamente significativas, probablemente debido al limitado tamaño muestral, se pudieron apreciar puntuaciones más elevadas en el grupos MC, lo cual va en consonancia con los resultados de estudios anteriores (29, 30). En el estudio de Adams et al. (29), se obtuvieron unos resultados de 30% de depresión en ME frente al 56,6% en MC, evaluados mediante el cuestionario PHQ-9 ($p<0,001$) y en el de Zebemholzer et al. (30) estos porcentajes fueron del 41% y 64% respectivamente ($p<0,0001$). Queda claro en ambos casos la mayor frecuencia de sintomatología depresiva en la MC respecto a la ME.

Las diferencias existentes entre ambos grupos en las puntuaciones del cuestionario ISI los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos, aunque una vez más, la puntuación media del grupo de MC supera al de ME, apoyando los estudios de Pompili et al. y Kim et al. (5, 6).

En nuestro estudio, como aspecto novedoso se evaluó la relación entre la ideación suicida y la migraña empleando el cuestionario INQ-12, ya que la pertenencia frustrada y la carga percibida son elementos clave en el desarrollo de esta conducta. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la variable *Pertenencia frustrada al grupo*, siendo esta más acusada en el grupo de MC. Aunque las diferencias en la variable *Sensación de ser una carga* no llegaron a

ser estadísticamente significativas, fueron consideradas clínicamente relevantes. Estos resultados apoyan el estudio de Colman et al, que manifiesta un incremento del riesgo de suicidio en relación con sufrir migraña (31).

Consideramos que nuestro trabajo tiene como principal fortaleza el ser el primer estudio que profundiza en un aspecto como la ideación suicida en relación con la migraña, además de corroborar otros problemas psicosociales. A su vez, destacaríamos como limitaciones el escaso tamaño muestral, el sesgo de selección derivado de la necesidad de tener acceso a Internet y no haber incluido en el cuestionario ninguna pregunta relativa a la frecuencia e intensidad de las crisis de cefalea.

Conclusiones

Como se evidencia en los resultados de los cuestionarios sobre los diversos aspectos psicosociales estudiados, los pacientes con MC padecen una mayor discapacidad e impacto sobre la calidad de vida en relación con las crisis de migraña que aquellos que padecen ME. En cuanto al tratamiento preventivo, se observa un inadecuado abordaje de una parte de nuestros pacientes con MC, por lo que consideramos que sería conveniente un diagnóstico precoz y especializado de esta patología con el fin de que sea tratada de manera correcta.

Bibliografía

1. Minen MT, Younger DS. (2016). Epidemiology of migraine. Neurol Clin. 34: 849-861.

2. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). (2018). The international classification of headache disorders, 3rd edition. Cephalalgia. 38: 1-211.

3. Carod-Artal FJ, Irimia P, Ezpeleta D. (2012). Migraña crónica: definición, epidemiología, factores de riesgo y tratamiento. Rev Neurol. 54: 629-637.

4. http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/headache-disorders, consultada el día 08-06-2018.

5. Pompili M, Di Cosimo D, Innamorati M, Lester D, Taratelli R, Mastelletti P. (2009). Psychiatric comorbidity in patients with chronic daily headache and migraine: a selective overview including personality traits and suicide risk. J Headache Pain. 10: 283-290.

6. Kim J, Cho SJ, Kim WJ, Yang KI, Yun CH, Chu MK. (2017). Insufficient sleep is prevalent among migraineurs: a population-based study. J Headache Pain. 18: 50-57.

7. Ødegård SS, Engstrøm M, Sand T, Stovner LJ, Zwart JA, Hagen K. (2010). Associations between sleep disturbance and primary headaches: the third Nord-Trøndelag Health Study. J Headache

Pain. 11: 197-206.

8. Uribe-García B. (2008). Impacto de la migraña. Acta Neurol Colomb. 24: 28-33.

9. Álvarez Pérez P, Núñez Vázquez Á. Manejo de la migraña. Cad Aten Primaria. 2007; 14: 266-273.

10. Rendas-Baum R, Yang M, Varon SF, Bloudek LM, DeGryse RE, Kosinski M. (2014). Validation of the Headache Impact Test (HIT-6) in patients with chronic migraine. Health Qual Life Outcomes. 12: 117-126.

11. Smelt AF, Assendelft WJ, Terwee CB, Ferrari MD, Blom JW. (2014). What is a clinically relevant change on the HIT-6 questionnaire? An estimation in a primary-care population of migraine patients. Cephalalgia. 34: 29-36.

12. Gagnon C, Bélanger L, Ivers H, Morin CM. (2013). Validation of the Insomnia Severity Index in primary care. J Am Board Fam Med. 26: 701-710.

13. Morin CM, Belleville G, Bélanger L, Ivers H. (2011). The Insomnia Severity Index: psychometric indicators to detect insomnia cases and evaluate treatment response. Sleep. 34: 601-608.

14. Whisman MA, Richardson ED. (2015). Normative data on the Beck Depression Inventory—Second Edition (BDI-II) in college students. J Clin Psychol. 71: 898-907.

15. Sanz J, Perdigón AL, Vazquez C. (2003). Adaptación española del Inventario para la Depresión de Beck-II (BDI-II): 2. Propiedades psicométricas en población general. Clínica y Salud. 14: 249-280.

16. Ordoñez-Carrasco JL, Salgueiro M, Sayans-Jiménez P, Blanc-Molina A, García-Leiva JM, Calandre EP et al. (2018). Psychometric properties of the Spanish version of the 12-item Interpersonal Needs Questionnaire in fibromyalgia syndrome patients. An Psicol. 34: 274-282.

17. Freedenthal S, Lamis DA, Osman A, Kahlo D, Gutiérrez PM. (2011). Evaluation of the psychometric properties of the Interpersonal Needs Questionnaire-12 in samples of men and women. J Clin Psychol. 67: 609-623.

18. Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología. 3. Guía oficial de práctica clínica en cefaleas de la Sociedad Española de Neurología. [2015). Ezpeleta D y Pozo-Rosich P eds.. Sociedad Española de Neurología. ISBN: 978-84-15198-99-4.

19. Pascual J. (2012). Migraña crónica: tratamiento. Rev Neurol. 54: 31-38.

20. Láinez JM, Castillo J, González VM, Otero M, Mateos V, Leira R et al. (2007). Guía de recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la migraña en la práctica clínica. Rev Clin Esp. 207: 190-193.

21. Cho SJ, Song TJ, Chu MK. (2017). Treatment update of chronic migraine. Curr Pain Headache Rep. 21: 26.

22. Diener HC, Bussone G Van Oene JC, Lahaye M, Schwalen S, Goadsby PJ. (2007). Topiramate reduces headache days in chronic migraine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Cephalalgia. 27: 814-823.

23. Escher CM, Paracka L, Dressler D, Kollewe K. (2017). Botulinum toxin in the management of chronic migraine: clinical evidence and experience. Ther Adv Neurol Disord. 10: 127-135.

24. Silberstein SD, Dodick DW, Aurora SK et al. (2015). Percent of patients with chronic migraine who responded per onabotulinumtoxin A treatment cycle: PREEMPT. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 86: 996-1001.

25. Becker WJ. (2017). The diagnosis and management of chronic migraine in primary care. Headache. 57: 1471-1481.

26. Giacomozzi AR, Vindas AP, Silva AA, Bordini CA, Buonanotte CF, Roesler CA et al. (2013). Latin American consensus on guidelines for chronic migraine treatment. Arq Neuropsiquiatr. 71: 478-486.

27. Pringsheim T, Davenport W, Mackie G, Worthington I, Aubé M, Christie SN et al. (2012). Canadian Headache Societyguideline for migraine prophylaxis. Can J Neurol Sci. 39: 1-59.

28. Diener HC, Holle-Lee D, Nägel S, Gaul C. (2017). Headache treatment. Dtsch Med Wochenschr. 142: 418-426.

29. Adams AM, Serrano D, Buse DC, Reed ML, Marske V, Fanning KM et al. (2015). The impact of chronic migraine: The Chronic Migraine Epidemiology and Outcomes (CaMEO) Study methods and baseline results. Cephalalgia. 35: 563-578.

30. Zebenholzer K, Lechner A, Broessner G, Lampl C, Luthringshausen G, Wuschitz A et al. (2016). Impact of depression and anxiety on burden an management of episodic and chronic headache – a cross-sectional multicentre study in eight Austrian headache centres. J Headache Pain. 17: 15-24.

31. Colman I, Kingsbury M, Sareen J, Bolton J, Walraven C. (2015). Migraine headache and risk of self-harm and suicide: a population-based study in Ontario, Canada. Headache. 56: 132-140.

Capítulo 4

El papel de los probióticos y prebióticos durante el neurodesarrollo infantil

Cerdó T, Campoy C

Resumen

En los últimos años, varios estudios han demostrado la existencia de un vínculo entre los centros emocionales y cognitivos del cerebro y las funciones periféricas a través de la interacción bidireccional entre el sistema nervioso central y el sistema nervioso entérico. Es por ello que el uso de bacterias como terapia para tratar enfermedades mentales ha atraído mucho el interés. Investigaciones recientes han encontrado que hay una variedad de mecanismos por los cuales las bacterias pueden enviar señales al cerebro e influenciar varios procesos en relación con la neurotransmisión, la neurogénesis y el comportamiento. Los datos derivados tanto de experimentos in vitro como de ensayos clínicos in vivo han respaldado algunas de estas nuevas implicaciones para la salud. Si bien el avance molecular reciente ha proporcionado fuertes indicaciones para apoyar y justificar el papel de la microbiota intestinal en el eje intestino-cerebro, aún no está claro si las manipulaciones a través de los probióticos y la administración de prebióticos podrían ser beneficiosas en el tratamiento de problemas neurológicos. Conocer no solo la composición de la comunidad microbiana intestinal, sino también su funcionalidad, es esencial para poder desarrollar futuras estrategias de atención médica personalizadas. En este capítulo, exploramos y resumimos los posibles efectos beneficiosos de los probióticos y los prebióticos en el proceso del neurodesarrollo y en la prevención y el tratamiento de ciertas enfermedades neurológicas humanas, destacando las perspectivas actuales y futuras en dicho campo de investigación.

Introducción

En los últimos años se ha visto que los microorganismos que habitan dentro del intestino humano están implicados en el desarrollo y funcionamiento de varios procesos fisiológicos básicos, como la digestión, la inmunidad y el mantenimiento de la homeostasis. Además, esta comunidad microbiana intestinal también ha sido vinculada con un importante papel en múltiples patologías, incluyendo numerosas enfermedades inflamatorias tales como la obesidad (59). Igualmente, recientes estudios han demostrado que la microbiota intestinal desempeña un papel muy importante en el desarrollo y la función del sistema nervioso central (SNC) a través de rutas específicas que incluyen diversas vías metabólicas, neuroendocrinas e inmunes (78). En particular, estos estudios han permitido descubrir una comunicación bidireccional, entre el cerebro y la microbiota intestinal dando lugar al término *"eje microbiota-intestino-cerebro"* (31, 61, 66).

Aunque los mecanismos por los cuales la microbiota intestinal se comunica con el cerebro todavía no están claros, el vínculo entre ambos componentes ha sido establecido mediante las señales del sistema inmune y el nervio vago. Los componentes asociados a la microbiota intestinal como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglucanos, flagelinas u otros componentes estructurales son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) tales como los receptores Toll-like (TLR) o los receptores tipo NOD (NLR), o bien son reconocidos por receptores similares RIG-1 (RLR) presentes en células epiteliales e inmunes, productoras de citocinas, hormonas y otras señales moleculares, que actúan como neurotransmisores dentro del SNC (67). Es por ello que complementar la terapia nutricional con prebióticos y probióticos específicos podría alterar la excitabilidad de las neuronas sensoriales del sistema nervioso entérico, permitiendo influir en ciertos procesos biológicos implicados en diversas enfermedades (7).

El objetivo de este capítulo es informar sobre los últimos hallazgos relacionados con la influencia del establecimiento de la microbiota intestinal en las ventanas críticas del desarrollo neurológico, así como las interacciones entre la microbiota intestinal y su papel en el *eje cerebro-intestino* del huésped. Además, se muestran los últimos avances en los efectos de la administración de probióticos y prebióticos para influir en trastornos neurológicos específicos. Finalmente, se proporcionan recomendaciones para futuras investigaciones sobre este tema.

- **Eje microbiota-intestino-cerebro**

El cerebro y el intestino presentan una comunicación recíproca constante, a través del sistema nervioso central, el sistema endocrino-inmunitario, el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA), el sistema nervioso autónomo, el sistema nervioso entérico y la propia microbiota intestinal (11). Esta comunicación bidireccional permite que la señalización del cerebro influya en los aspectos motores, sensoriales y secretores del tracto digestivo intestinal, al igual que la propia señalización del intestino afecta a la función cerebral, sobre todo al hipotálamo y la amígdala, los cuales son los reguladores del estrés (9, 10, 53).

A pesar de que el impacto recíproco del tracto gastrointestinal sobre la función cerebral se ha reconocido desde mediados del siglo XIX (14), hasta hace poco no se había considerado la importancia de los microorganismos sobre el desarrollo y la función del SNC y diversas enfermedades neurológicas. El descubrimiento del microbioma intestinal ha añadido un nuevo componente a esta señalización bidireccional sugiriendo un profundo papel de la microbiota intestinal en la formación de la neuroquímica cerebral y el comportamiento emocional (42).

La mayoría de los datos que demuestran el papel de la microbiota dentro del eje del intestino-cerebro se han obtenido a partir de estudios con animales libres de gérmenes y el uso de probióticos y antibióticos. En humanos, la evidencia de una posible interacción entre el *eje microbiota-intestino-cerebro* ha sido sugerida a partir de la asociación entre una disbiosis, los trastornos del sistema nervioso central (v.g. autismo, conductas de ansiedad-depresión) y alteraciones gastrointestinales funcionales. Probablemente, una mejor comprensión de las alteraciones como el intestino irritable, podría proporcionar nuevas terapias dirigidas (6). Por ejemplo, en ratones se ha comprobado que alimentación con prebióticos disminuye los síntomas de una conducta similar a la ansiedad humana inducida por un factor estresante (72). El beneficio terapéutico potencial de la microbiota intestinal también ha sido demostrado en un modelo de ratón que presenta un trastorno del espectro autista (30) y en un modelo de ratón que padece la enfermedad de Parkinson (63), reduciendo en ambos casos los efectos de dichas enfermedades.

A pesar de que varios estudios han demostrado que los cambios en la microbiota intestinal podrían afectar a las funciones fisiológicas, conductuales y

cognitivas del cerebro, el mecanismo exacto del eje *microbiota intestinal-cerebro* aún no se ha descifrado en su totalidad (8). Aunque muchos de los efectos de la microbiota intestinal o de potenciales probióticos en la función cerebral dependen de la actividad vagal (57), existen mecanismos independientes del nervio vago que juegan un papel importante en las interacciones microbiota-cerebro, ya que se ha visto que la vagotomía no influye en ciertos aspectos de la comunicación (20).

La microbiota y los agentes probióticos tienen efectos directos sobre el sistema inmune; esta vía de comunicación adicional entre los microbios intestinales y el cerebro resulta de gran interés. Las moléculas de señalización del sistema inmune, como son las citocinas y las quimiocinas, pueden acceder al cerebro desde la periferia a través del nervio vago o directamente a través de los órganos circunventriculares (69). Se ha observado que el efecto de la rifaximina, un antibiótico de amplio espectro no sistémico, se asocia con una mayor abundancia de *Lactobacillus* en el íleon. Cuando la rifaximina se administra en ratas, previamente estresadas privándolas de agua de forma crónica o mediante restricciones repetidas, aumenta la expresión de la proteína ocludina y disminuye la expresión de interleuquina 17 pro-inflamatoria, interleucina 6 y ARNm del factor de necrosis tumoral en la parte distal del íleon, que alivia la hiperalgesia visceral (82).

El triptófano (Trp) es un α-aminoácido precursor del neurotransmisor serotonina y la hormona melatonina. (71). El metabolito del L-triptófano, la L-quinurenina, y otros productos derivados de su degradación llevan a cabo diversas funciones biológicas, destacando la dilatación de los vasos sanguíneos durante la inflamación y la regulación de la respuesta inmune (49). Además, hay evidencia que sugiere que la bacteria probiótica *Bifidobacterium infantis*, afecta el metabolismo del triptófano aumentando las concentraciones de quinurenina en plasma (17). Por otro lado, se ha visto que una falta de la 5-hidroxitriptamina (5-HT, o serotonina), cuyo precursor es el triptófano, se asocia con la elevación de Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima inmunomoduladora, durante la activación inmune y durante la colonización primaria del intestino (21, 22, 46). Además, se ha descubierto que diferentes especies microbianas intestinales afectan la fisiología del huésped, produciendo diversas neuromoléculas involucradas en la regulación del estado de ánimo, como las

especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* spp que generan ácido gamma-aminobutírico (GABA) o *Candida*, *Streptococcus*, *Escherichia* y *Enterococcus* spp, cuales sintetizan 5-HT o incluso *Bacillus* spp. que produce dopamina (33).

Cabe destacar que la microbiota intestinal puede reconocer y sintetizar metabolitos como ácidos biliares, vitaminas, colina y ácidos grasos de cadena corta (AGCCs) que son esenciales para la salud del hospedador, desempeñando un papel importante en el desarrollo cerebral. Los AGCCs butirato, acetato y propionato son los productos finales de la fermentación anaeróbica de la fibra dietética y el almidón en el intestino grueso, y ciertos estudios indican su influencia en el *eje microbiota-intestino-cerebro*, los cuales se incorporan a la circulación a través de la vena porta (62). Ha sido demostrado que el butirato puede atravesar la barrera hematoencefálica, ya que el butirato oral puede inducir un incremento dosis-dependiente de la acetilación de la histona H3 nuclear en las neuronas y la glia en ratones, debido a su potencial para inhibir la deacetilación de las histonas.(44). Además, el propionato y otros AGCC han sido clasificados como ligandos de los receptores acoplados a proteína G (GPR) 41 y 43, que también pueden estar implicados en la regulación de la adipogénesis y la liberación de adipocinas mediadas por GPR (2).

En conclusión, aunque en los últimos años ha habido un progreso para conocer la importancia de las señales microbianas que afectan al desarrollo cerebral, especialmente las que influyen en los circuitos neuronales que se encuentran detrás del comportamiento social en los mamíferos, son necesarias más investigaciones para desentrañar el funcionamiento de la intrincada red del *eje microbiota-intestino-cerebro*.

Probióticos

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) propusieron en 2001 la definición de probióticos como *"microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped"* (36), reafirmándolo en 2014 (32). Sin embargo, actualmente existen algunas pautas de seguridad estándar sobre su administración oral, destacando que recientemente se ha publicado una Guía Clínica de productos probióticos en Canadá y EE. UU que enumera solo productos probados en humanos (79). Por el contrario, la aplicación

de algunos probióticos (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) y prebióticos (inulina, oligofructosa) no requieren la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ya que se encuentran presentes en nuestra ingesta dietética diaria (83). Aunque se han realizado avances con posibles nuevos probióticos, como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* o *Roseburia* spp., los cuales producen butirato que es considerado beneficioso para la salud (5), aún son necesarios más estudios para llegar a su libre utilización en humanos.

Ha sido sugerido que los probióticos desempeñan un papel beneficioso en una gran variedad de enfermedades humanas, habiéndose comprobado una mejora en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), la prevención de enfermedades alérgicas y el asma o la protección contra la enfermedad atópica en el bebé durante el embarazo y la lactancia (1, 80, 84). Además, se ha visto que los probióticos también reducen el tiempo de consumo de antibióticos y mejoran enfermedades relacionadas con el sistema inmune, como las enfermedades inflamatorias intestinal (EII), enfermedad celíaca, síndrome metabólico y diabetes (35, 56).

En los últimos años, la búsqueda de probióticos que puedan afectar las funciones cognitivas ha aumentado. Dichos probióticos se denominan ***psicobióticos*** y se definen como organismos vivos que, cuando se ingieren en cantidades adecuadas, producen efectos beneficiosos para la salud de pacientes que padecen enfermedades psiquiátricas (19). Para estudiar la capacidad de los probióticos en la prevención de la depresión en humanos, Messaoudi et al (43), administró un probiótico que contenía *Lactobacillus helveticus* R0052 y *Bifidobacterium longum* R0175 durante 30 días, disminuyendo las puntuaciones globales de la escala de ansiedad y depresión hospitalaria (HAD) y el índice de severidad global del inventario de síntomas de Hopkins (HSCL-90), ya que disminuyó las sub-puntuaciones de somatización, depresión y hostilidad a la ira en los individuos de estudio. Por el contrario, en un estudio reciente llevado a cabo por Romijn et al. (60), se administró un probiótico que contenía *Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium longum,* en 79 participantes que no estaban tomando medicamentos psicotrópicos en ese momento y con puntaciones alteradas, al menos, de forma moderada en las medidas del estado de ánimo. No encontraron pruebas de que la formulación probiótica fuera efectiva en el tratamiento del mal

estado de ánimo o en la reducción de los niveles inflamatorios y otros biomarcadores. La falta de efecto observado en los síntomas del estado de ánimo pudo deberse a la gravedad, cronicidad o resistencia al tratamiento de los individuos que participaban en dicho estudio de intervención.
Por otro lado, se sabe que otros probióticos modulan la producción de serotonina en el cerebro. Los niveles bajos de serotonina se han relacionado con la depresión y respecto a esto, se ha visto que *Bifidobacterium infantis* ha sido sugerido como un potencial probiótico antidepresivo, debido a que su ingestión oral incrementa los niveles del precursor de la serotonina, el triptófano, en el plasma en ratas (17).

Otra vía por la cual los probióticos afectan al estado de ánimo es su capacidad para modular el dolor en el intestino. Un estudio reciente informó que el efecto de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 en el tratamiento de niños con dolor abdominal funcional y en el síndrome de intestino irritable, se asocia con una posible reducción de la intensidad del dolor (46). En este sentido, otro estudio también informó que una mezcla probiótica de *Bifidobacterium infantis* M-63, *breve* M-16V y *long* BB536 se asoció con mejoría en niños con enfermedad inflamatoria intestinal pero no en niños con dispepsia funcional (25).

Una alteración en la microbiota intestinal, que generalmente es inducida por una infección bacteriana o exposición crónica a antibióticos, ha sido descrita como un posible contribuyente al trastorno del espectro autista (ASD) (48). Solo unos pocos estudios se han llevado a cabo para determinar la influencia de los probióticos en sujetos con ASD. Un estudio informó que la administración de *Lactobacillus acidophilus* en 22 sujetos ASD disminuyó la concentración de D-arabinitol y la relación de D-arabinitol a L-arabinitol en la orina, que es un metabolito secretado por la mayoría de las especies de Candida patógenas y cuya presencia en orina es elevada en pacientes autistas (37). Otro estudio informó que una combinación de *L. acidophilus*, *L.casei*., *L.delbrueckii*, *Bifidobacterium longum* y *B.bifidum*, formulada con imunomodulador Del-Immune V (lisado de *Lactobacillus rhamnosus* V) disminuyó la gravedad de los síntomas de ASD y mejoró los síntomas gastrointestinales en 33 niños (81). Además, un estudio reciente con ***"Children Dophilus"*** (una combinación de 3 especies de *Lactobacillus*, 2 especies de *Bifidobacterium* y 1 cepa de *Streptococcus*) en 10 niños con ASD, mostró que la disfunción gastrointestinal era mayor en niños con ASD y en los hermanos en

comparación con los controles, además de la existencia de una asociación muy fuerte en la cantidad de *Desulfovibrio* spp. con la severidad del autismo. Tras de la intervención, el ratio Bacteroidetes / Firmicutes, y las cantidades de *Desulfovibrio* spp. y *Bifidobacterium* spp. fueron normalizados en heces de niños autistas (75). Sin embargo, los efectos de los tratamientos con probióticos en niños con ASD deben evaluarse a través de un ensayo controlado riguroso. Actualmente, se está llevando a cabo un estudio se llevará a cabo por Santochi et al. Este estudio administrará a un grupo de 100 preescolares con ASD, un probiótico multiespecie (una cepa de *Streptococcus thermophilus* DSM 24731, tres cepas de Bifidobacterium (*B.breve* DSM 24732, *B. longum* DSM 24736, *B. infantis* DSM 24737), y cuatro cepas de Lactobacillus (*L. acidophilus* DSM 24735, *L. plantarum* DSM 24730, *L. paracasei* DSM 24733, *L. delbrueckii* subsp. bulgaricus DSM 24734), que tratarán de proporcionar nuevos conocimientos clínicos y patrones neurofisiológicos en respuesta al tratamiento con probióticos en pacientes con ASD(64).

Otra patología donde se están probando los probióticos es en la esquizofrenia y en el trastorno bipolar. Uno de los primeros ensayos con probióticos en la esquizofrenia utilizó un probiótico combinado de *Lactobacillus rhammosus* cepa GG y *Bifidobacterium animals* subsp. *Lactis* cepa Bb12, cuyos resultados no mostraron diferencias significativas en la gravedad de los síntomas psiquiátricos entre los suplementos de probióticos y el placebo (18). Sin embargo, otros estudios han encontrado que la administración de suplementos probióticos altera significativamente los niveles de varias proteínas séricas, incluido el factor von Willebrand, el factor neurotrófico derivado del cerebro, así como la reducción del nivel de anticuerpos contra el hongo *Candida albicans* (68, 74).

A pesar de las escasas evidencias que apoyan el uso de probióticos en humanos con ciertos trastornos neurológicos, se necesitan estudios futuros sobre este tema para definir el riesgo de los probióticos en las intervenciones terapéuticas, así como para encontrar posibles probióticos para la modulación efectiva de estos trastornos. Por último, hay que tener en cuenta que los efectos de los probióticos en la salud suelen ser específicos de la cepa, por lo que es importante caracterizar los probióticos a nivel de cepa y con la nomenclatura actual, así como depositarlos en una colección de cultivos internacionales. Therefore, the effects of one probiotic

strain should not be generalized to others without confirmation in separate studies. Por lo tanto, los efectos de una cepa probiótica no deberían generalizarse a otros sin confirmación en estudios separados.

Prebióticos

Aunque en 1921, Rettger & Cheplin (58) iniciaron una investigación sobre cómo el consumo de carbohidratos estimula el enriquecimiento de *Lactobacilli*, el concepto de prebiótico se definió por primera vez en 1995 como un *"ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y / o la actividad de uno o un número limitado de bacterias que ya residen en el colon"* (29). Sin embargo, se han realizado numerosas definiciones desde entonces (3, 28, 55), siendo la actual Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos (ISAPP) la que ha llegado a un consenso donde proponen la definición de prebiótico como: un sustrato que es utilizado selectivamente por microorganismos huéspedes que confieren un beneficio para la salud (27). Por lo tanto, los antibióticos, los minerales, las vitaminas y los bacteriófagos no se consideran prebióticos porque afectan a la composición de la microbiota a través de mecanismos que no implican la utilización selectiva de los microorganismos del huésped.

Entre el grupo de sustancias reconocidas por su capacidad para influir en la salud gastrointestinal se encuentran ciertas fibras fermentables solubles, algunos oligosacáridos no digeribles y los oligosacáridos de la leche humana (HMO).

Se ha descrito cómo la fibra influye en la saciedad. Un mecanismo consiste en aumentar el tiempo de masticación de los alimentos ricos en fibra, lo que promueve la producción de saliva y ácido gástrico y aumenta la distensión gástrica, desencadenando señales vagales aferentes de saciedad que contribuyen a este fin. Otro mecanismo se basa en la disminución de la velocidad del vaciado gástrico y en la disminución de la tasa de absorción de glucosa en el intestino delgado. En consecuencia, la respuesta a la insulina también puede atenuarse, correlacionándose en ocasiones con la saciedad y la saciedad (70). Varias hormonas (por ejemplo, ghrelina, polipéptido YY, péptido similar al glucagón) se han relacionado con la saciedad, ya que son enviadas al cerebro, regulando la ingesta de alimentos y el balance energético global (52). Recientemente, en un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo con 42 niños de edades

entre 7 y 12 años con sobrepeso y obesidad, Hume et al. investigaron el efecto de la administración de inulina / d enriquecida con oligofructosa contra el placebo (maltodextrina); la suplementación prebiótica mejoró el índice de apetito subjetivo, reduciendo la ingesta de energía en niños los mayores pero no en los niños más pequeños (34).

Los oligosacáridos no digeribles (NDO) son carbohidratos de bajo peso molecular, intermediarios entre azúcares simples y polisacáridos. El enriquecimiento de la dieta con NDO ha brindado la oportunidad de mejorar la microecología intestinal, incluidas las poblaciones bacterianas, los perfiles bioquímicos y los efectos fisiológicos, por lo que sus usos prebióticos han aumentado rápidamente en los últimos años (47). Los efectos de los oligosacáridos no digeribles en el tratamiento de los trastornos del neurodesarrollo no están claros. Las terapias basadas en alimentos probablemente podrían ser beneficiosas para los niños con predisposición genética para desarrollar ASD o trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) (73). Además, los NDOs han sido sugeridos como estimuladores del crecimiento y/o de la actividad de bifidobacteria y bacterias del ácido láctico en el colon, lo cual quizá influya en el desarrollo neuronal del huésped (13, 41).

Los oligosacáridos de la leche humana han sido reconocidos por su capacidad para influir en la salud gastrointestinal y aumentar la proporción de *Bifidobacteriaceae* y *Bacteroidaceae* (24, 51). Aunque los investigadores han intentado asignar un papel para esos prebióticos en el neurodesarrollo, muchos estudios indican que no hay influencia. Van den Berg et al., no encontraron evidencias de que el uso de cGOS / lcFOS / pAOS en neonatos prematuros a los 24 meses mejorase los resultados del desarrollo neurológico (76). LeCouffe et al., estudiaron el efecto de la suplementación enteral con una mezcla prebiótica (oligosacáridos neutros y ácidos) en el período neonatal, pero encontraron que esta suplementación no tuvo efecto sobre el neurodesarrollo (40). Sin embargo, estuvieron de acuerdo en que la reducción del número de *Bifidobacteria* y las infecciones neonatales graves durante el período neonatal se asociaron con resultados del desarrollo neurológico más bajos, lo que indica la relevancia del microbioma y la respuesta inmune en los procesos del neurodesarrollo.

Se deben realizar más estudios para determinar si los prebióticos pueden considerarse en la prevención de trastornos del desarrollo neurológico en los bebés y para comprender el mecanismo de acción al estimular ciertas taxones bacterianos o actividades bacterianas dentro de la microbiota intestinal. Se deben establecer los programas de eficacia, seguridad y dosificación para cada producto prebiótico en los estudios de seguimiento a largo plazo.

- **Perspectivas de futuro**

Durante los últimos años, numerosos estudios in vivo e in vitro se han llevado a cabo para conocer la influencia de los probióticos y los prebióticos en la fisiología del huésped. De estos estudios se deduce que la microbiota intestinal puede regular la inflamación, la adiposidad, la saciedad, el gasto energético y el metabolismo de la glucosa (16). Aunque los experimentos in vivo han avanzado en animales, hay muy pocos ensayos clínicos de calidad, aleatorizados a doble ciego, controlados con placebo para evaluar los efectos de los probióticos y los prebióticos en la modulación del metabolismo humano y su efecto modulador sobre el neurodesarrollo (4, 50).

La mayoría de los esfuerzos se han centrado en proporcionar información sobre los mecanismos por los cuales ciertos probióticos regulan la colonización y protegen contra los patógenos a través de la activación del sistema inmune de la mucosa y la competencia por nutrientes limitados (15, 38). Sin embargo, esto pone de relieve la necesidad urgente de una comprensión más profunda de la dinámica de los probióticos en el intestino y su papel en el cerebro en desarrollo. Los enfoques alternativos contra enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, autismo, enfermedad por déficit de atención e hiperactividad, entre otros, podrían consistir en la manipulación del ecosistema intestinal mediante probióticos recombinantes que expresen biomoléculas terapéuticas o el trasplante de microbiota fecal e incluso terapia con fagos.

Paton et al. expresó los genes de glucosiltransferasa de *Neisseria meningitidis* o *Campylobacter jejuni* en una cepa inofensiva de *Escherichia coli* (CWG308), para crear un probiótico recombinante para el tratamiento y la prevención de enfermedades diarreicas causadas por cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* (54). El mismo grupo desarrolló de forma similar un probiótico recombinante para

el tratamiento y la prevención del cólera (23). Por otro lado, un estudio reciente ha demostrado que el trasplante de microbiota mejora los síntomas de ASD en niños, lo cual persistió durante al menos 8 semanas después de haber finalizado el tratamiento (39). Finalmente, para la terapia de fagos, con el aumento de las bacterias resistentes a los antibióticos, se ha intensificado el interés en el uso de proteínas fago o derivadas de fagos para tratar las infecciones bacterianas. El único ensayo clínico de terapia de fagos aprobado en el intestino humano se llevó a cabo en 120 pacientes con diarrea causada por *Escherichia coli*, que fueron infectados por una mezcla de colífago. El tratamiento no pudo solucionar la diarrea, aunque no se observaron efectos adversos provocados por los fagos (65). Aun así, una alternativa para el futuro podría ser el uso de cócteles de fagos personalizados. Estos fagos se dirigirían directamente a patógenos bacterianos pre-identificados, aunque el principal inconveniente sería la alta variación interindividual del microbioma intestinal y la aprobación legislativa. Es por ello que más ensayos clínicos son necesarios para probar la efectividad de este tratamiento (12, 45).

Varias evidencias han sugerido el papel de los prebióticos como nuevas estrategias para prevenir la progresión de varias enfermedades. Verma et al. encontraron en un estudio comparativo donde administraron prebióticos inulina o lactulosa durante la fase de iniciación de la carcinogénesis de colon inducida químicamente en ratas con dihidrocloruro de 1,2-dimetilhidrazina (DMH), que la inulina prebiótica puede tener un mejor potencial profiláctico para reducir los biomarcadores de carcinogénesis de colon en el fase de iniciación (77). Los futuros estudios prebióticos deberían tratar de confirmar la causalidad entre un beneficio de salud observado y mecanismos mediados por la microbiota. Con este fin, son necesarios estudios bien controlados, con placebo, ciegos en vivo que explotan las más nuevas tecnologías multiméricas. En el caso del prebiótico para humanos, una evaluación completa de la microbiota intestinal utilizando procedimientos moleculares de nueva generación para explotar el uso selectivo del sustrato, como la metabolómica aplicada a las heces, podría identificar biomarcadores confiables de efectos beneficiosos (26).

En resumen, el conocimiento de los efectos de los probióticos y prebióticas es esencial para evaluar dosis específicas y para determinar posibles reacciones adversas y resultados beneficiosos para la fisiología de los humanos. Por lo tanto,

aún se necesitan más estudios para confirmar y aclarar los posibles mecanismos implicados y si los probióticos y los prebióticos pueden constituir nuevas estrategias terapéuticas para prevenir las enfermedades humanas.

Bibliografía

1. Al-muzafar HM, Amin KA. (2017). Probiotic mixture improves fatty liver disease by virtue of its action on lipid profiles, leptin, and inflammatory biomarkers. BMC complementary and alternative medicine 17:43.

2. Arora, T, Sharma R, Frost G. (2011). Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? Appetite 56:511-515.

3. Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD, Walter J. (2015). Towards a more comprehensive concept for prebiotics. Nature reviews Gastroenterology & hepatology 12:303-310.

4. Burton JP, Drummond BK, Chilcott CN, Tagg JR, Thomson WM, Hale JD, Wescombe PA. (2013). Influence of the probiotic Streptococcus salivarius strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. Journal of medical microbiology 62:875-884.

5. Canani RB, Di Costanzo M, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. (2011). Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. World journal of gastroenterology: WJG 17:1519.

6. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology 28:203.

7. 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.

8. Cerdó T, Ruiz A, Campoy C. (2017). Human Gut Microbiota and Obesity During Development, Adiposity-Omics and Molecular Understanding. InTech.

9. Collins SM, Bercik P. (2013). Gut microbiota: intestinal bacteria influence brain activity in healthy humans. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology 10:326-327.

10. Collins SM, Surette M, Bercik P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. Nature Reviews Microbiology 10:735-742.

11. Cong, X, Henderson WA, Graf J, McGrath JM. (2015). Early life experience and gut microbiome: the brain-gut-microbiota signaling system. Advances in neonatal care: official journal of the National Association of Neonatal Nurses 15:314.

12. Cooper CJ, Mirzaei MK, Nilsson AS. (2016). Adapting drug approval pathways for bacteriophage-based therapeutics. Frontiers in Microbiology 7.

13. Costalos C, Kapiki A, Apostolou M, Papathoma E. (2008). The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants. Early human development 84:45-49.

14. Cryan, JF, Dinan TG. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. Nature reviews neuroscience 13:701-712.

15. Christensen KV, Morch MG, Morthorst TH, Lykkemark S, Olsen A. (2017). Microbiota, Probiotic Bacteria and Ageing, p. 411-429, Ageing: Lessons from C. elegans. Springer.

16. Daliri EB-M, Lee BH. (2015). New perspectives on probiotics in health and disease. Food Science and Human Wellness 4:56-65.

17. Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG. (2008). The probiotic Bifidobacteria infantis: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. Journal of psychiatric research 43:164-174.

18. Dickerson FB, Stallings C, Origoni A, Katsafanas E, Savage CL, Schweinfurth LA, Goga J, Khushalani S, Yolken RH. (2014). Effect of probiotic supplementation on schizophrenia symptoms and association with gastrointestinal functioning: a randomized, placebo-controlled trial. The primary care companion for CNS disorders 16.

19. Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. (2013). Psychobiotics: a novel class of psychotropic. Biological psychiatry 74:720-726.

20. Dinan TG, Stilling RM, Stanton C, Cryan JF. (2015). Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior. Journal of psychiatric research 63:1-9.

21. El Aidy S, Derrien M, Aardema R, Hooiveld G, Richards S, Dane A, Dekker J, Vreeken R, Levenez F, Doré J. (2013). Transient inflammatory-like state and microbial dysbiosis are pivotal in establishment of mucosal homeostasis during colonisation of germ-free mice. Beneficial microbes 5:67-77.

22. El Aidy S, Kleerebezem M. (2013). Molecular signatures for the dynamic process of establishing intestinal host–microbial homeostasis: potential for disease diagnostics? Current opinion in gastroenterology 29:621-627.

23. Focareta A, Paton JC, Morona R, Cook J, Paton AW. (2006). A recombinant probiotic for treatment and prevention of cholera. Gastroenterology 130:1688-1695.

24. Garrido D, Ruiz-Moyano S, Lemay DG, Sela DA, German JA, Mills DA. (2015). Comparative transcriptomics reveals key differences in the response to milk oligosaccharides of infant gut-associated bifidobacteria. Scientific reports 5:13517.

25. Giannetti E, Maglione M, Alessandrella A, Strisciuglio C, De Giovanni D, Campanozzi A, Miele E, Staiano A. (2017). A mixture of 3 Bifidobacteria decreases abdominal pain and improves the quality of life in children with irritable bowel syndrome: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. Journal of Clinical Gastroenterology 51:e5-e10.

26. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. Nature reviews Gastroenterology & hepatology.

27. Gibson GR, Hutkins RW, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics.

28. Gibson GR, Probert HM, Van Loo J, Rastall RA, Roberfroid MB. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutrition research reviews 17:259-275.

29. Gibson GR, Roberfroid MB. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. The Journal of nutrition 125:1401.

30. Heberling CA, Dhurjati PS, Sasser M. (2013). Hypothesis for a systems connectivity model of autism spectrum disorder pathogenesis: Links to gut bacteria, oxidative stress, and intestinal permeability. Medical hypotheses 80:264-270.

31. Hennessey CH, Sladek J, Miller E, Kim J, Kaur M, Gareau MG. (2017). Intestinal Dysbiosis During Neonatal Development Alters the Microbiota-Gut-Brain Axis in Adulthood. The FASEB Journal 31:890.895-890.895.

32. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature reviews Gastroenterology & hepatology 11:506-514.

33. Holzer P, Farzi A. (2014). Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis, p. 195-219, Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease. Springer.

34. Hume MP, Nicolucci AC, Reimer RA. (2017). Prebiotic supplementation improves appetite control in children with overweight and obesity: a randomized controlled trial. The American Journal of Clinical Nutrition 105:790-799.

35. Ivanov II, Honda K. (2012). Intestinal commensal microbes as immune modulators. Cell host & microbe 12:496-508.

36. Joint F. (2001). WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina. October:1-4.

37. Kałużna-Czaplińska J, Błaszczyk S. (2012). The level of arabinitol in autistic children after probiotic therapy. Nutrition 28:124-126.

38. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. Nature immunology 14:685-690.

39. Kang D-W, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, Khoruts A, Geis E, Maldonado J, McDonough-Means S. (2017). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. Microbiome 5:10.

40. LeCouffe NE, Westerbeek EA, van Schie PE, Schaaf VA, Lafeber HN, van Elburg RM. (2014). Neurodevelopmental outcome during the first year of life in preterm infants after supplementation of a prebiotic mixture in the neonatal period: a follow-up study. Neuropediatrics 45:022-029.

41. Luk B, Engevik M, Hall A, Versalovic J. (2016). Bifidobacterium dentium Modulates Expression of Genes Important to Synaptic Plasticity and Neurodevelopment in the Cerebellum of Germ-Free Mice. The FASEB Journal 30:1027.1021-1027.1021.

42. Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF, Tillisch K. (2014). Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. Journal of Neuroscience 34:15490-15496.

43. Messaoudi M, Violle N, Bisson J-F, Desor D, Javelot H, Rougeot C. (2011). Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in healthy human volunteers. Gut microbes 2:256-261.

44. Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Sobue G. (2004). Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. Human molecular genetics 13:1183-1192.

45. Mirzaei MK, Maurice CF. (2017). Menage a trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. Nature Reviews Microbiology 15:397-408.

46. Moffett JR, Namboodiri MA. (2003). Tryptophan and the immune response. Immunology and cell biology 81:247-265.

47. Mussatto SI, Mancilha IM. (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review. Carbohydrate polymers 68:587-597.

48. Nasrat AM, Nasrat RM, Nasrat MM. (2017). Autism; An Approach for Definite Etiology and Definitive Etiologic Management. American Journal of Medicine and Medical Sciences 7:108-118.

49. Nguyen NT, Kimura A, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. (2010). Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences 107:19961-19966.

50. Ooi L-G, Liong M-T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. International journal of molecular sciences 11:2499-2522.

51. Oozeer R, van Limpt K, Ludwig T, Amor KB, Martin R, Wind RD, Boehm G, Knol J. (2013). Intestinal microbiology in early life: specific prebiotics can have similar functionalities as human-milk oligosaccharides. The American Journal of Clinical Nutrition 98:561S-571S.

52. Page A, Kentish S. (2016). Plasticity of gastrointestinal vagal afferent satiety signals. Neurogastroenterology & Motility.

53. Palma G, Collins SM, Bercik P, Verdu EF. (2014). The microbiota–gut–brain axis in gastrointestinal disorders: stressed bugs, stressed brain or both? The Journal of physiology 592:2989-2997.

54. Paton AW, Jennings MP, Morona R, Wang H, Focareta A, Roddam LF, Paton JC. (2005). Recombinant probiotics for treatment and prevention of enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea. Gastroenterology 128:1219-1228.

55. Pineiro M, Asp N-G, Reid G, Macfarlane S, Morelli L, Brunser O, Tuohy K. (2008). FAO Technical meeting on prebiotics. Journal of Clinical Gastroenterology 42:S156-S159.

56. Rayes N, Seehofer D, Hansen S, Boucsein K, Müller AR, Serke S, Bengmark S, Neuhaus P. (2002). Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. Transplantation 74:123-128.

57. Rea K, O'Mahony SM, Dinan TG, Cryan JF. (2017). The Role of the Gastrointestinal Microbiota in Visceral Pain.

58. Rettger LF, Cheplin HA. (1921). A Treatise on the Transformation of the Intestinal Flora: With Special Reference to the Implantation of Bacillus Acidophilus, vol. 13. Yale University Press.

59. Rieder R, Wisniewski PJ, Alderman BL, Campbell SC. (2017). Microbes and mental health: a review. Brain, behavior, and immunity.

60. Romijn AR, Rucklidge JJ, Kuijer RG, Frampton C. (2017). A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of Lactobacillus helveticus and Bifidobacterium longum for the symptoms of depression. Australian & New Zealand Journal of Psychiatry:0004867416686694.

61. Ross SM. (2017). Microbiota-Gut-Brain Axis, Part 1: An Integrated System of Immunological, Neural, and Hormonal Signals. Holistic nursing practice 31:133-136.

62. Russell WR, Hoyles L, Flint HJ, Dumas M-E. (2013). Colonic bacterial metabolites and human health. Current opinion in microbiology 16:246-254.

63. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. Cell 167:1469-1480. e1412.

64. Santocchi E, Guiducci L, Fulceri F, Billeci L, Buzzigoli E, Apicella F, Calderoni S, Grossi E, Morales MA, Muratori F. (2016). Gut to brain interaction in Autism Spectrum Disorders: a randomized controlled trial on the role of probiotics on clinical, biochemical and neurophysiological parameters. BMC psychiatry 16:183.

65. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F, Bourdin G, McCallin S, Ngom-Bru C, Neville T. (2016). Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh. EBioMedicine 4:124-137.

66. Scott KA, Ida M, Peterson VL, Prenderville JA, Moloney GM, Izumo T, Murphy K, Murphy A, Ross RP, Stanton C. (2017). Revisiting Metchnikoff: Age-related alterations in microbiota-gut-brain axis in the mouse. Brain, behavior, and immunity.

67. Schroeder BO, Bäckhed F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. Nature medicine 22:1079-1089.

68. Severance EG, Gressitt KL, Stallings CR, Katsafanas E, Schweinfurth LA, Savage CL, Adamos MB, Sweeney KM, Origoni AE, Khushalani S. (2016). Candida albicans exposures, sex specificity and cognitive deficits in schizophrenia and bipolar disorder. npj Schizophrenia 2:16018.

69. Sherwin E, Rea K, Dinan TG, Cryan JF. (2016). A gut (microbiome) feeling about the brain. Current opinion in gastroenterology 32:96-102.

70. Slavin J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. Nutrients 5:1417-1435.

71. Slominski A, Semak I, Pisarchik A, Sweatman T, Szczesniewski A, Wortsman J. (2002). Conversion of L-tryptophan to serotonin and melatonin in human melanoma cells. FEBS letters 511:102-106.

72. Tarr AJ, Galley JD, Fisher SE, Chichlowski M, Berg BM, Bailey MT. (2015). The prebiotics 3′ Sialyllactose and 6′ Sialyllactose diminish stressor-induced anxiety-like behavior and colonic microbiota alterations: Evidence for effects on the gut–brain axis. Brain, behavior, and immunity 50:166-177.

73. Theije CG, Bavelaar BM, Lopes da Silva S, Korte SM, Olivier B, Garssen J, Kraneveld AD. (2014). Food allergy and food-based therapies in neurodevelopmental disorders. Pediatric Allergy and Immunology 25:218-226.

74. Tomasik J, Yolken RH, Bahn S, Dickerson FB. (2015). Immunomodulatory effects of probiotic supplementation in schizophrenia patients: a randomized, placebo-controlled trial. Biomarker insights 10:47.

75. Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, Bakos J, Vlkova B, Babinska K, Ostatnikova D. (2015). Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. Physiology & behavior 138:179-187.

76. Van den Berg JP, Westerbeek EA, Bröring-Starre T, Garssen J, van Elburg RM. (2016). Neurodevelopment of preterm infants at 24 months after neonatal supplementation of a prebiotic mix: A randomized trial. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition 63:270-276.

77. Verma A, Shukla G. (2013). Administration of prebiotic inulin suppresses 1, 2 dimethylhydrazine dihydrochloride induced procarcinogenic biomarkers fecal enzymes and preneoplastic lesions in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats. Journal of Functional Foods 5:991-996.

78. Vuong H, Yano J, Fung T, Hsiao E. (2017). The Microbiome and Host Behavior. Annual review of neuroscience.

79. Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. (2005). Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. Pediatrics 115:5-9.

80. West CE, Jenmalm MC, Kozyrskyj AL, Prescott SL. (2016). Probiotics for treatment and primary prevention of allergic diseases and asthma: looking back and moving forward. Expert review of clinical immunology 12:625-639.

81. West R, Roberts E, Sichel L, Sichel J. (2013). Improvements in gastrointestinal symptoms among children with autism spectrum disorder receiving the Delpro® probiotic and immunomodulator formulation. J Prob Health 1:2.

82. Xu D, Gao J, Gillilland M, Wu X, Song I, Kao JY, Owyang C. (2014). Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats. Gastroenterology 146:484-496. e484.

83. Yoo JY, Kim SS. (2016). Probiotics and prebiotics: Present status and future perspectives on metabolic disorders. Nutrients 8:173.

84. Zhang G-Q, Hu H-J, Liu C-Y, Zhang Q, Shakya S, Li Z-Y. (2016). Probiotics for prevention of atopy and food hypersensitivity in early childhood: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Medicine 95.

Capítulo 5

Alteraciones genéticas, autofagia y disfunción lisosomal en la enfermedad de Parkinson

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

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo del movimiento relacionado con la edad, que resulta de la muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) y se caracteriza por la presencia de inclusiones intracitoplásmicas de agregados de α-sinucleína (α-sin), llamados cuerpos de Lewy (LB) y neuritas de Lewy (LN). La acumulación de esta proteína refleja claramente una alteración en los procesos de degradación proteica, siendo un denominador común con otras enfermedades neurodegenerativas (ND). La degradación de las proteínas mediada por autofagia vía lisosoma es la ruta catabólica más frecuentemente utilizada por las células neuronales. La actividad defectuosa en este sistema puede contribuir notablemente al desarrollo de enfermedades ND. Hasta la fecha, la evidencia más significativa de la relación entre la disfunción de los lisosomas y la EP radica en el gen *GBA*, que codifica la enzima β-glucocerebrosidasa (β-GCasa). Las mutaciones en este gen se han considerado como el principal factor de riesgo genético que predispone a la enfermedad. Sin embargo, hay otras enzimas lisosomales y genes clásicamente asociados a la EP, cuyas disfunciones se han asociado con parkinsonismo y agregación de α-sin.

Dada la importancia de los mecanismos de degradación en el mantenimiento de la homeostasis celular, se pone de manifiesto la gran importancia de ellos en el estudio de los mecanismos genéticos y moleculares en la patogénesis de la EP. Este capítulo tiene como objetivo abordar la contribución de los mecanismos de degradación proteica, focalizándose en la importancia de la autofagia y la

disfunción lisosomal en la patología de la EP de forma breve, clara y sencilla, discutiendo la literatura reciente.

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común y la primera en cuanto a trastornos del movimiento. La EP, por su elevada prevalencia, afecta a 1 o 2 individuos por cada 1000 de la población a cualquier edad y al 1 por ciento en la población mayor de 60 años, siendo la edad el principal factor de riesgo para su desarrollo (1). Aunque su diagnóstico es principalmente clínico, es una enfermedad multisistémica que muestra diferentes fenotipos clínicos, definidos fundamentalmente por tres grupos de síntomas: a) alteraciones motoras características como son bradicinesia, rigidez y temblor; b) síntomas no motores como son anosmia, deterioro cognitivo, depresión o demencia y c) presencia de cuerpos de Lewy (LB). Estas alteraciones motoras y no motoras en la EP vienen acompañadas a nivel neuropatológico de una marcada pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra (SNpc) y la formación de agregados o inclusiones de una proteína, la α-sinucleína (α-sin), en el citoplasma de dichas células. Allí forman los llamados cuerpos de Lewy y/o neuritas de Lewy (LN) según la localización de éstos (2).

Durante mucho tiempo, la EP se ha considerado como una enfermedad de causas casi exclusivamente ambientales y casi ninguna influencia genética. Actualmente, gracias a los distintos avances en el ámbito de la investigación genética, se está consiguiendo dilucidar la base genética de varias formas de EP y trastornos parkinsonianos relacionados. A nivel general, en la EP se pueden distinguir dos formas principales: la más común es la forma esporádica o idiopática, que corresponde aproximadamente el 95% de los casos diagnosticados. Esta forma se caracteriza por un inicio de la enfermedad en edades avanzadas (≈ 60 años o más), sin causas genéticas conocidas, donde principalmente factores ambientales podrían explicar su etiología. Sin embargo, en esta forma de EP también están implicadas alteraciones genéticas, como se discutirá más adelante. Por otro lado, sólo el 5% de los casos constituyen la forma familiar de la enfermedad, donde el inicio de ésta suele ser temprano, y está asociada a distintas mutaciones genéticas

de herencia autosómica dominante y recesiva (SNCA, PARK2 / PARKIN, PARK7 / DJ1, PINK1 y LRRK2) (3).

Aunque la etiología de la EP todavía se desconoce, los mecanismos involucrados en la patología son muy variados: estrés oxidativo, alteración y disfunción mitocondrial, factores inflamatorios y metabolismo proteico deficitario, entre otros. Todos ellos conducirían a la neurodegeneración y muerte celular, que a su vez actuaría retroalimentando el proceso neurodegenerativo (4).

La acumulación de agregados de proteínas alteradas no es sólo un signo característico de la EP, sino que también ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas (ND), como las llamadas sinucleopatías (que incluirían la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y la atrofia multisistémica (MSA)), y las tauopatías [como la Enfermedad de Alzheimer (AD) y la demencia frontotemporal (FTD)). En otras, como la enfermedad de Huntington, también se encuentran depósitos de proteína mutada (5). La acumulación de proteínas en todos ellos refleja un claro fallo en los mecanismos de degradación celular, impidiendo la eliminación correcta de estos agregados, favoreciendo su acumulación y causando finalmente la muerte neuronal (6).

A través de los mecanismos de degradación, las células son capaces de reciclar y/o eliminar cualquier material susceptible de ser un producto de deshecho para la misma, como puede ser el derivado de fallos en su biogénesis o formación, material proveniente de mutaciones, orgánulos celulares dañados, agregados de proteínas o microorganismos invasores. Gracias a ello, estos mecanismos contribuyen a mantener la homeostasis celular, salud y longevidad del organismo (7). El mecanismo principal utilizado por las células del sistema nervioso central (SNC) para mantener la homeostasis es el proceso de autofagia o macro-autofagia. Específicamente, la degradación de la proteína α-sin mediada por autofagia vía lisosoma es la vía catabólica más comúnmente utilizada por las células dopaminérgicas. De esta forma, la disfunción lisosomal se ha relacionado recientemente con la patogénesis de la EP y otras sinucleopatías, sugiriendo de nuevo la importancia de un posible metabolismo defectuoso que podría favorecer la agregación y/o formación de compuestos citotóxicos en la enfermedad ND (8). Durante el proceso de autofagia vía lisosoma, el contenido citoplasmático donde se encuentra el material a eliminar se vierte y almacena en vesículas de doble

membrana llamadas autofagosomas, las cuales tienen proteínas características asociadas a la membrana (como la proteína LC3-II) que permiten identificarlas. Posteriormente se produce el tráfico de esas vesículas que son dirigidas al lisosoma, el orgánulo celular que contiene reservas de enzimas como la Catepsina D, que proporcionan un medio interno ácido necesario para la digestión del material, donde finalmente se integra el contenido citoplásmico mediante la fusión de las membranas de ambas estructuras (autofagosoma-lisosoma) para su degradación (9). Este proceso no sólo se produce en situaciones patológicas, sino que se produce también de manera fisiológica y continua en la mayoría de las células de nuestro organismo; además según el tipo de material a degradar, puede llevarse a cabo en muchos casos por otros mecanismos de degradación más sencillos como puede ser la autofagia mediada por chaperonas o la micro autofagia (10). Como ocurre en la EP, y en muchas otras enfermedades ND que van acompañadas por la formación y acumulación de agregados proteicos en las células del SNC, es factible pensar que existe un mecanismo o vía afectados en el proceso metabólico durante la autofagia en células neuronales y de la glía (11, 12, 13).

- **Alteraciones genéticas, autofagia y disfunción lisosomal en la enfermedad de Parkinson**

Hay muchas evidencias del importante papel que juegan los procesos de degradación celular y los mecanismos implicados en la vía autofágica y la patología ND. En el caso concreto de la EP, hay evidencias de que ambas están relacionadas con la enfermedad, ya sea de origen familiar o esporádico.

Como se ha dicho, la EP es principalmente un trastorno ND esporádico. Sin embargo, se han descrito una gran cantidad de mutaciones genéticas que causan la enfermedad en un porcentaje de casos. Las mutaciones en los genes α-sinucleína (*SNCA*), *UCHL1*, *DJ-1* (PARK7) y PTEN-quinasa 1 (*PINK1*) son relativamente raros, mientras que las mutaciones autosómicas recesivas en el gen *Parkin* son la causa principal de parkinsonismo de inicio temprano (34, 35). Las mutaciones en heterocigosis en el gen *LRRK2* (PARK8), que codifica para la enzima dardarina, es la causa más frecuente de EP autosómica dominante conocida hasta la fecha (36, 37). Una gran parte de las mutaciones genéticas que causan EP en su forma

familiar codifican para proteínas involucradas de alguna manera en distintos procesos de degeneración o autofagia, incluyendo *PINK-1*, *Parkin* (una ubiquitina ligasa), *UCHL1* (ubiquitina hidrolasa L1), DJ-1 (actividad chaperona), y LRRK2 (actividad quinasa) (14-16). Las mutaciones en el gen *PINK-1* causan formas autosómicas recesivas de EP de inicio temprano. Esta forma mutada del gen se encuentra fundamentalmente relacionada con la regulación mitocondrial (disfunción mitocondrial, deformación morfológica, especies reactivas de oxigeno aumentadas, etc.), contribuyendo así a la neurodegeneración (17, 18). Así, el papel de PINK-1 en el proceso degenerativo está estrechamente ligado a la mitofagia, es decir, la degradación selectiva de las mitocondrias o parte de ellas, dañadas o envejecidas. Aunque su relación con el proceso de autofagia todavía es desconocida, hay estudios que indican que la pérdida de la función de PINK1 o su déficit produce un aumento de la formación de autofagosomas (con un incremento de la proteína de membrana LC3-II) en modelos celulares y animales, promoviendo la inducción del proceso de autofagia (19, 20). La proteína Parkin se encuentra mutada en la EP autosómica recesiva juvenil. Junto con PINK-1 está estrechamente ligada al control de calidad mitocondrial, se localiza en las mitocondrias favoreciendo la degradación de las mitocondrias dañadas. Aunque normalmente las mitocondrias dañadas son eliminadas por el sistema ubiquitina-proteasoma, estudios previos en modelos celulares de mamíferos han concluido que las mitocondrias despolarizadas se degradan por autofagia (21, 22). Acorde con estos resultados, se observó una colocalización de Parkin y LC3-II durante la mitofagia inducida por la pérdida del potencial mitocondrial específico, lo que sugiere una posible regulación del proceso de autofagia mediada por Parkin en la degradación mitocondrial (23). La ubiquitinación de proteínas es un proceso de modificación postraduccional reversible, que regula muchas vías de señalización vitales en la célula. Fundamentalmente consiste en el marcaje del material para que sea reconocido por los distintos mecanismos de degradación para su eliminación. Es un proceso reversible, pues existen otras proteínas (DUBs) que pueden anular la conjugación de la ubiquitina con el sustrato (24). En este caso, UCHL1 es una proteína DUB que ha sido ampliamente estudiada por su relación con la EP familiar autosómica dominante (25). Hay estudios que describen una posible regulación de la vía autofágica por parte de UCHL1, pues se observó que, inhibida, producía la

activación de la vía autofágica en varios modelos de sobreexpresión de α-sin (26, 27). Además, se hallaron datos indicativos de que UCHL1 interactúa con LC3 e inhibe la formación de autofagosomas basándose en su actividad DUB, indicando de nuevo un papel crítico de esta proteína en la regulación de la autofagia (28). Sin embargo, el mecanismo de cómo UCHL1 regula la autofagia sigue siendo un misterio.

Se han identificado las mutaciones en el gen *DJ-1* como una causa rara de la EP autosómica recesiva, representando aproximadamente el 1-2% de todas las formas de aparición temprana de la EP. Estas formas están causadas por la pérdida de función de la proteína para la que codifica (29). DJ-1 está implicada a nivel fisiológico en diversas funciones, incluyendo la modulación de la transcripción, funciones tipo chaperona y propiedades antioxidantes. Aunque la proteína se encuentra ampliamente distribuida por varios compartimentos celulares, se ha descrito que la principal función fisiológica de DJ-1 cuando se encuentra a nivel mitocondrial es contribuir a la protección celular (30). Al igual que PINK1 y Parkin está muy ligada a la homeostasis mitocondrial. En condiciones de elevado estrés oxidativo, DJ-1 permite extinguir las especies reactivas de oxigeno (ROS) (31), mientras que la pérdida de función en modelos in vivo produce una mayor vulnerabilidad a la inhibición del complejo I en la mitocondria, una disfunción mitocondrial que sabemos juega un papel importante en la muerte celular y en el proceso degenerativo (32). En un estudio reciente, usando un modelo celular humano donde se bloqueó la actividad de DJ-1, se mostró un descenso de la degradación mitocondrial, dando lugar a un aumento de ellas y su masa, además de un incremento en la acumulación de lisosomas (33). Esto representa una clara respuesta autofágica debida a la neurodegeneración y apoya la idea de un eje mitocondrial-lisosomal y la importancia de la vía autofágica mediada por el lisosoma para mantener la homeostasis celular.

En el gen *LRRK2* se han identificado varias mutaciones, la más común es la G2019S, siendo responsable del 3-7% de los casos familiares de EP de origen europeo y encontrándose también en el 1-2% de casos esporádicos de EP en Europa y América del Norte (38). Aunque la función de la proteína LRKK2 a nivel fisiológico y patológico no es del todo conocida, hay evidencias moleculares de su posible participación en el tráfico de vesículas y en la vía autofagia mediada por el

lisosoma. La sobre-expresión tanto de la proteína LRRK2 como de su forma mutada (G2019S) produce un efecto inhibidor en la función lisosomal asociado con la acumulación de sustratos como la proteína α-sin asociada a la EP (39). Además, en modelos celulares, de mosca y ratón se ha encontrado que tanto la sobreexpresión como la inhibición o silenciamiento de LRRK2 produce una acumulación de vesículas alterando el proceso de autofagia (40-42). En otro estudio, se encontró que la expresión de la forma mutada de la proteína LRKK2, donde la actividad quinasa se encuentra alterada, provocaba una disminución en la actividad lisosomal, impidiendo la degradación de las proteínas y alterando el pH lisosomal. Con respecto al tráfico vesicular ha sido relacionada con otras proteínas asociadas con la EP como son ATP13A2 y VPS35. La primera se trata de un canal iónico de transporte situado en la membrana del lisosoma, mientras que la segunda está implicada en el transporte retrógrado de proteínas en la célula mediado por endosomas hacia el aparato de Golgi (red trans-Golgi) (43). Estos estudios sugieren una posible relación entre una actividad lisosomal alterada en la EP y la proteína LRRK2.

Clásicamente la forma esporádica de la enfermedad ha sido asociada con la exposición a factores ambientales, sin ninguna implicación genética. Pero gracias a los estudios de asociación del genoma completo (GWAS)en grandes poblaciones se está proponiendo que la variedad esporádica de la EP también tiene una base genética, con múltiples genes implicados. Entre ellos se encuentran dos de los genes vinculados a la EP familiar con herencia autosómica dominante, como son *SNCA* y *LRRK2*. Esto demostraría que los mecanismos patogénicos a nivel molecular son similares en ambas formas de la enfermedad. (44). El gen *SNCA* codifica para la proteína α-sin. A pesar de las distintas variaciones o polimorfismos encontrados para este gen involucrados en la EP, todos ellos dan como resultado el mismo efecto patológico, la acumulación y agregación de la α-sin. La forma mal plegada de ella se encuentra en los LB y es el principal marcador patológico de la EP. Estos agregados proteicos se acumulan provocando la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Del mismo modo, las deficiencias en los sistemas de control de calidad de las proteínas en la célula, incluidas las que afectan a los mecanismos de chaperona, ubiquitina-proteasoma y autofagia, pueden acelerar la acumulación y agregación de α-sin (45). A su vez, la acumulación y agregación de α-sin puede

actuar de manera recíproca para promover la alteración de la homeostasis de proteínas y perpetuar así un círculo vicioso. La α-sin acumulada/agregada que no es eliminada eficientemente por la célula puede alterar físicamente la topografía celular y/o interferir con la fisiología celular normal, incluyendo estrés en el retículo endoplásmico (RE), disfunción mitocondrial y neurotransmisión defectuosa, que prolongado, podría llevar a la muerte neuronal (46-48).

Dada la estrecha relación entre la proteína LRRK2 y la disfunción lisosomal mencionada anteriormente, merece destacarla como una proteína con una función importante en el mecanismo patológico de la EP esporádica. La disfunción lisosomal ha sido recientemente relacionada con la patogénesis de la EP y de otras sinucleopatías. La asociación más significativa es la que existe entre el gen *GBA*, que codifica para la enzima lisosomal β-glucocerebrosidasa (β-GCasa) y la EP. La presencia de mutaciones en heterocigosis en *GBA* se ha considerado como uno de los principales factores de riesgo genético que predispone al desarrollo de esta enfermedad (49). El descubrimiento de esta asociación tuvo lugar en la clínica, con la identificación de síntomas parkinsonianos en pacientes con la enfermedad de Gaucher (EG). Este es un desorden lisosomal causado por mutaciones en homocigosis en ese mismo gen. Estudios posteriores determinaron, además, que en familiares de estos enfermos (muchos de ellos siendo portadores de mutaciones en *GBA*) había una mayor incidencia de EP (50). Estas investigaciones demostraron una consistente asociación entre ambas enfermedades, sugiriendo un papel importante de la disfunción lisosomal en el proceso ND de la EP. Además, modelos celulares y animales con deficiencia en la actividad β-GCasa tienden a acumular α-sin en el citoplasma celular. Se ha sugerido que esta enzima se une directamente a la α-sin en el lisosoma, y contribuye a la estabilización de las formas solubles oligoméricas, consideradas altamente neurotóxicas (51). Estudios posteriores han demostrado que las formas en α-hélice de la α-sin, unidas a la membrana lisosomal, interaccionan con la β-GCasa dando lugar a su inhibición (52). Sin embargo, este mecanismo parece revertir en presencia de saposina C, un cofactor natural de esta enzima lisosomal (53). Por otra parte, Gegg y cols (54) reportaron una reducción de la actividad enzimática de la β-GCasa en el cerebro de pacientes con EP y mutaciones en GBA, así como en casos esporádicos. Posteriormente, Murphy y cols. (55) corroboraron estos resultados, demostrando que existía un

déficit de actividad β-GCasa en el cerebro de pacientes con la variedad esporádica de EP, siendo responsable de la acumulación de α-sin y de alteraciones en el metabolismo lipídico. En un trabajo reciente, Bae y cols. (56) publicaron que la depleción de β-GCasa promueve la propagación de los agregados de α-sin entre las células, sugiriendo que este papel tóxico podría ser responsable de la progresión de la enfermedad. Todos estos resultados indican claramente la fuerte relación entre β-GCasa y α-sin, aunque queda por determinar si la formación de los agregados proteicos es consecuencia del fallo de la actividad lisosomal o, por el contrario, si es el aumento de concentración de α-sin el que promueve la disfunción de la β-GCasa. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios, aún se desconocen los mecanismos moleculares que relacionan las mutaciones en *GBA* con el desarrollo de EP.

Recientes estudios describen evidencias que relacionan otras enzimas lisosomales con distintos tipos de parkinsonismos o patologías asociadas. Por ejemplo se han asociado deficiencias en las enzimas ATP13A2, β-hexosaminidasa, β-galactosidasa, y catepsina D con depósitos de α-sin. El síndrome de Kufor-Rakeb es un tipo de parkinsonismo de herencia autosómica recesiva causado por mutaciones en el gen *ATP13A2* (PARK9), que codifica para una proteína transmembrana lisosomal. Diferentes estudios han comprobado que una pérdida de función de esta proteína conlleva una disminución de la capacidad de degradación del lisosoma, y por consiguiente a una acumulación de α-sin (57, 58). La enfermedad de Sandhoff, un tipo de gangliosidosis GM2 hereditaria, es otra enfermedad lisosomal causada por la deficiencia de la enzima β-hexosaminidasa, dando lugar a la acumulación de gangliósidos en el sistema nervioso central y periférico. En ratones knockout para este gen, se ha demostrado, la presencia de agregados de α-sin en una amplia distribución de áreas cerebrales, incluidas caudado, putamen y sustancia negra (59). La gangliosidosis GM1, causada por la deficiencia de la enzima β-galactosidasa, se caracteriza por cursar con una distonía generalizada y parkinsonismo entre otros síntomas (60). Al igual que en la gangliosidosis GM2, se han reportado inclusiones de α-sin en neuronas y glía de individuos con esta enfermedad (61). La lipofuscinosis neuronal coroidea incluye otro grupo heterogéneo de enfermedades lisosomales hereditarias caracterizadas clínicamente por una disminución de las capacidades cognitivas, epilepsia y

pérdida de la visión por degeneración retiniana. Uno de los genes identificados por ser causante de este desorden es el *CTSD*, que codifica para la catepsina D (62). Experimentos in vitro han demostrado que la catepsina D juega un papel importante en la degradación de α-sin, de tal forma que su deficiencia podría contribuir al efecto tóxico de estos agregados proteicos dentro de las células dopaminérgicas (63). Más aun, Chu y cols. (64) encontraron una mayor reducción de la expresión de catepsina D en neuronas nigrales positivas para inclusiones de α-sin en enfermos con EP comparados con sujetos sanos. Sin embargo, todavía se desconoce el alcance de estos genes en el desarrollo de la variedad esporádica de la EP, a excepción de *GBA*. En general, en todas estas enfermedades metabólicas descritas se ha observado depósitos de a-sin y neurodegeneración. Esto hace suponer que cualquier defecto en alguna de estas enzimas lisosomales podría contribuir también al desarrollo de la EP. No obstante son objetivo de estudio en más profundidad.

La agregación proteica no es la única consecuencia de la disfunción lisosomal. La mayoría de estas enzimas juegan un papel muy importante en el catabolismo de lípidos y glicoesfingolípidos. Por ejemplo, la β-GCasa lisosomal cataliza la conversión de glucosilceramida en ceramida y glucosa. La ceramida, junto con el colesterol, es responsable de la mayoría de las propiedades biofísicas de las membranas celulares y condiciona muchas de las interacciones lípidos-proteínas y procesos de señalización celular (65). Por tanto, la reducción de la enzima puede contribuir a la pérdida de estas propiedades y en su defecto a la muerte celular. La alteración del metabolismo de la ceramida se ha relacionado con el deterioro cognitivo característico de la enfermedad de Alzheimer (66). Mielke y cols (67), en un estudio piloto, también demostraron su vinculación con el daño cognitivo en la variedad esporádica de EP. En un trabajo reciente, en un modelo animal de EG neuropática causada por una doble mutación en el gen *GBA*, se ha observado cómo la acumulación de glucosilceramida conduce a un proceso ND (68). Otras deficiencias enzimáticas lisosomales, que conllevan a la acumulación de lípidos y colesterol, también cursan con neurodegeneración y demencia (69, 70). Es posible que la disfunción lisosomal asociada a la EP conduzca además a un metabolismo lipídico defectuoso que sea responsable de la disfunción cognitiva que se

encuentra en algunos pacientes con la enfermedad. Distintos estudios de investigación siguen en curso para esclarecer este papel.

Conclusiones

La identificación de las causas genéticas de la EP hace solo unos veinte años permitió conocer por primera vez los mecanismos moleculares que conducen a la neurodegeneración en este trastorno del movimiento tan prevalente. Estos mecanismos incluyen el mal plegamiento patológico de las proteínas relacionadas con la enfermedad, alteración de las vías de degradación de las proteínas mediada por ubiquitina, macro-autofagia y acumulación de agregados de proteínas (LB) en las áreas afectadas del cerebro. La acumulación de agregados de proteínas irregulares no es sólo un signo característico de la EP, sino que también ocurre en otras enfermedades ND, cursando de igual forma con la muerte de células del SNC. En esta revisión se ha destacado la estrecha relación existente entre los mecanismos de degradación proteica y la EP. En base a ello, es interesante conocer y promover el estudio de estos mecanismos, partiendo de la existencia de la herencia genética en la variante familiar, con el fin de conocer mejor los aspectos moleculares y vías alteradas en la patología de la EP. Esta revisión también pone de manifiesto la importancia del lisosoma como principal orgánulo involucrado en la correcta degradación del material celular, así como de la repercusión de la disfunción lisosomal en el metabolismo y acumulación de α-sin. No sólo se encuentra alterado el catabolismo de ciertas proteínas en las enfermedades ND, sino que tienen un papel fundamental en el catabolismo y metabolismo de ciertos lípidos, guardando una estrecha relación con el apropiado funcionamiento cognitivo como ocurría en la EA, haciendo evidente la necesidad de conocer más sobre el perfil lipídico en la EP y evaluar, en caso de estar alterado, si está vinculado a un fallo lisosomal, así como su repercusión en la progresión de la enfermedad y la aparición de déficit cognitivo.

La EP es considerada a nivel mundial como la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer, con una incidencia anual de 18 casos por cada 100.000 individuos. Esta cifra invita a sumar esfuerzos en apoyar aquellos trabajos de investigación que contribuyan a descifrar los mecanismos patogénicos que conducen a la EP y de ese modo acelerar su cura

definitiva. La detección de biomarcadores asociados específicamente con la EP podría contribuir a una mejora en el diagnóstico temprano de la enfermedad y al desarrollo de tratamientos farmacológicos más eficientes. Hasta ahora, el tratamiento farmacológico de la EP sigue siendo sintomático. Sin embargo, es posible que el uso de terapias encaminadas a reestablecer actividades metabólicas alteradas, como son una actividad lisosomal disfuncional, contribuyan notablemente a retrasar la muerte neuronal.

Bibliografía

1. Tysnes OB, Storstein A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. J Neural Transm. 124(8),901-905.

2. Klingelhoefer L, Reichmann H. (2017). Parkinson's disease as a multisystem disorder. J Neural Transm. 124(6),709-713.

3. Trinh J, Farrer M. (2013). Advances in the genetics of Parkinson disease. Nat Rev Neurol. 9, 445-54.

4. Andersen J. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. Nat Rev Neurosci. 5, 18-25.

5. Bourdenx M, Koulakiotis NS, Sanoudou D, Bezard E, Dehay B, Tsarbopoulos A. (2017). A protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. Prog Neurobiol. 155, 171-193.

6. Ebrahimi-Fakhari D, McLean P, Unni B. (2011). Alpha-synuclein´s degradation in vivo. Opening a new (cranial) window on the roles of degradation pathways in Parkinson disease. Autophagy. 8 (29), 281-283.

7. Lippai M, Szatmári Z. (2017). Autophagy—from molecular mechanisms to clinical relevance. Cell Biol Toxicol. 33, 145-168.

8. Manzoni C, Lewis P. (2013). Dysfunction of the autophagy/lysosomal degradation pathway is a shared feature of the genetic synucleinopathies. FASEB Jorunal. 27,3424-3429.

9. Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, Füllgrabe J, Jackson A, Jimenez Sanchez M, Karabiyik C, Licitra F, Lopez Ramirez A, Pavel M, Puri C, Renna M, Ricketts T, Schlotawa L, Vicinanza M, Won H, Zhu Y, Skidmore J, Rubinsztein DC. (2017). Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. Neuron. 93, 1015-1034.

10. Hartl F, Hayer-Hartl M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. Nat Struct Mol Biol. 16, 574-81.

11. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. Nature. 441(7095), 885-9.

12. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. Nature. 441(7095), 880-4.

13. Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL, Iwata J, Kominami E, Chait BT, K. Tanaka K, Yue Z. (2007). Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. Proc Natl Acad Sci. 104 (36), 14489-14494.

14. Ciechanover A, Kwon YT. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. Exp Mol Med. 47,e147.

15. Cook C, Stetler C, Petrucelli L. (2012). Disruption of protein quality control in Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 2(5), a009423.

16. Moscovitz O, Ben-Nissan G, Fainer I, Pollack D, Mizrachi L, Sharon M. (2015). The Parkinson's-associated protein DJ-1 regulates the 20S proteasome. Nat Commun. 6, 6609.

17. Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Yao Z, Abramov AY, Miljan EA, Keen G, Stanyer L, Hargreaves I, Klupsch K, Deas E, Downward J, Mansfield L, Jat P, Taylor J, Heales S, Duchen MR, Latchman D, Tabrizi SJ, Wood NW.(2008). PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. PLoS One. 3(6),e2455.

18. Moisoi N, Fedele V, Edwards J, Martins LM. (2014). Loss of PINK1 enhances neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease triggered by mitochondrial stress. Neuropharmacology. 77, 350-357.

19. Qi Z, Yang W, Liu Y, Cui T, Gao H, Duan C, Lu L, Zhao C, Zhao H, Yang H.(2011). Loss of PINK1 function decreases PP2A activity and promotes autophagy in dopaminergic cells and a murine model. Neurochem Int. 59, 572-581.

20. Gómez-Sánchez R, Yakhine-Diop SMS, Bravo-San Pedro JM, Pizarro-Estrella E, Rodríguez-Arribas M, Climent V, Martin-Cano FE, González-Soltero ME, Tandon A, Fuentes JM, González-Polo RA. (2016). PINK1 deficiency enhances autophagy and mitophagy induction. Molecular & Cellular Oncology. 3(2),e1046579.

21. Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ. (2001). The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. FASEB J. 15,2286–2287.

22. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. EMBO J. 27, 433–446.

23. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. The Journal of Cell Biology. 183(5), 795–803.

24. Komander D, Clague MJ, Urbé S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 10, 550–563.

25. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature. 395, 451–452.

26. Pukass K, Richter-Landsberg C. (2015). Inhibition of UCH-L1 in oligodendroglial cells results in microtubule stabilization and prevents alpha-synuclein aggregate formation by activating the autophagic pathway: implications for multiple system atrophy. Front Cell Neurosci. 9,163.

27. Cartier AE, Ubhi K, Spencer B, Vazquez-Roque RA, Kosberg KA, Fourgeaud L, Kanayson P, Patrick C, Rockenstein E, Patrick GN, Masliah E. (2012). Differential effects of UCHL1 modulation on alpha-synuclein in PD-like models of alpha-synucleinopathy. PLoS One. 7(4), e34713.

28. Yan C, Huo H, Yang C, Zhang T, Chu Y, Liu Y. (2018). Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 regulates autophagy by inhibiting autophagosome formation through its deubiquitinating enzyme activity. Biochem Biophys Res Commun. 497(2),726-733.

29. Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G, Heutink P. (2003). DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. Neurol Sci. 24: 159–160.

30. Blackinton J, Lakshminarasimhan M, Thomas KJ, Ahmad R, Greggio E, Raza AS, Cookson MR, Wilson MA. (2009). Formation of a stabilized cysteine sulfinic acid is critical for the mitochondrial function of the parkinsonism protein DJ-1. J Biol Chem. 284(10):6476-85.

31. Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H. (2004). DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. EMBO Rep. 5, 213–218.

32. Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, Wakeham A, You-Ten AJ, Kalia SK, Horne P, Westaway D, Lozano AM, Anisman H, Park DS, Mak TW. (2005). Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrindine (MPTP) and oxidative stress. Proc Natl Acad Sci. 102, 5215–5220.

33. Krebiehl G, Ruckerbauer S, Burbulla LF, Kieper N, Maurer B, Waak J, Wolburg H, Gizatullina Z, Gellerich FN, Woitalla D, Riess O, Kahle PJ, Proikas-Cezanne T, Krüger R. (2010) Reduced Basal Autophagy and Impaired Mitochondrial Dynamics Due to Loss of Parkinson's Disease-Associated Protein DJ-1. PLoS ONE. 5 (2), e9367.

34. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature. 392, 605–608.

35. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Denef le P, Wood NW, Agid Y, Brice A. (2000). French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease: Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. N Engl J Med. 342, 1560–1567.

36. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW, Singleton AB.(2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. Neuron. 44, 595–600.

37. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Muller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T.(2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. Neuron. 44, 601–607.

38. Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, Shaw K, Bhatia KP, Bonifati V, Quinn NP, Lynch J, Healy DG, Holton JL, Revesz T, Wood NW.(2005). A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. Lancet. 365, 415–416.

39. Orenstein SJ, Kuo SH, Tasset I, Arias E, Koga H, Fernandez-Carasa I, Cortes E, Honig LS, Dauer W, Consiglio A, Raya A, Sulzer D, Cuervo AM. (2013). Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. Nature Neuroscience. 16(4), 394–406.

40. Dodson MW, Leung LK, Lone M, Lizzio, MA, Guo, M. (2014). Novel ethyl methanesulfonate (EMS)-induced null alleles of the Drosophila homolog of LRRK2 reveal a crucial role in endolysosomal functions and autophagy in vivo. Disease Models & Mechanisms. 7(12), 1351–1363.

41. Plowey ED, Cherra SJ, Liu YJ, Chu CT. (2008). Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. Journal of Neurochemistry. 105(3), 1048–1056.

42. Ramonet D, Daher JP, Lin BM, Stafa K, Kim J, Banerjee R, Westerlund M, Pletnikova O, Glauser L, Yang L, Liu Y, Swing DA, Beal MF, Troncoso JC, McCaffery JM, Jenkins NA, Copeland NG, Galter D, Thomas B, Lee MK, Dawson TM, Dawson VL, Moore DJ. (2011). Dopaminergic Neuronal Loss, Reduced Neurite Complexity and Autophagic Abnormalities in Transgenic Mice Expressing G2019S Mutant LRRK2. PLoS ONE. 6(4), e18568.

43. Henry AG, Aghamohammadzadeh S, Samaroo H, Chen Y, Mou K, Needle E, Hirst WD. (2015). Pathogenic LRRK2 mutations, through increased kinase activity, produce enlarged lysosomes with reduced degradative capacity and increase ATP13A2 expression. Human Molecular Genetics.24(21), 6013–6028.

44. Chai C, Lim KL. (2013). Genetic Insights into Sporadic Parkinson's Disease Pathogenesis. Current Genomics. 14, 486-501.

45. Tan JM, Wong ES, Lim KL. (2009). Protein misfolding and aggregation in Parkinson's disease. Antioxid Redox Signal. 11(9), 2119-2134.

46. Smith WW, Jiang H, Pei Z, Tanaka Y, Morita H, Sawa A, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. (2005) Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alphasynuclein-induced toxicity. Hum Mol Genet. 14(24), 3801- 3811.

47. Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, Wong J, Takenouchi T, Hashimoto M, Masliah E.(2000) Alphasynuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. Am J Pathol. 157(2), 401-410.

48. Burre J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Sudhof TC.(2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. Science. 329(5999), 1663-1667.

49. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A, Chen CM, Clark LN, Condroyer C, De Marco EV, Dürr A, Eblan MJ, Fahn S, Farrer MJ, Fung HC, Gan-Or Z, Gasser T, Gershoni-Baruch R, Giladi N, Griffith A, Gurevich T, Januario C, Kropp P, Lang AE, Lee-Chen GJ, Lesage S, Marder K, Mata IF, Mirelman A, Mitsui J, Mizuta I, Nicoletti G, Oliveira C, Ottman R, Orr-Urtreger A, Pereira LV, Quattrone A, Rogaeva E, Rolfs A, Rosenbaum H, Rozenberg R, Samii A, Samaddar T, Schulte C, Sharma M, Singleton A, Spitz M, Tan EK, Tayebi N, Toda T, Troiano AR, Tsuji S, Wittstock M, Wolfsberg TG, Wu YR, Zabetian CP, Zhao Y, Ziegler SG. (2009). Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. New England Journal of Medicine. 361: 1651-1661.

50. Goker-Alpan O, Schiffmann R, LaMarca ME, Nussbaum RL, McInerney-Leo A, Sidransky E.(2004). Parkinsonism among Gaucher disease carriers. Journal of Medical Genetics. 41, 937-940.

51. Yap TL, Gruschus JM, Velayati A, Westbroek W, Goldin E, Moaven N, Sidransky E, Lee JC. (2011). Alpha-synuclein interacts with glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases. The Journal of Biological Chemistry.286,28080-28088.

52. Yap TL, Velayati A, Sidransky E, Lee JC. (2013). Membrane-bound α-synuclein interacts with glucocerebrosidase and inhibits enzyme activity. Molecular Genetics and Metabolism. 108 (1), 56-64.

53. Yap TL, Gruschus JM, Velayati A, Sidransky E, Lee Jc. (2013). Saposin C protects glucocerebrosidase against α-synuclein inhibition. Biochemistry. 52, 7161-7163.

54. Gegg ME, Burke D, Heales SJ, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, Schapira AH. (2012). Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. Annals of Neurology.72, 455-463.

55. Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E, Cooper A, Garner B, Halliday WS. (2014). Reduced glucocerebrosidase is associated with increased α-synuclein in sporadic Parkinson's disease. Brain. 137, 834-848.

56. Bae EJ, Yang NY, Song M, Lee CS, Lee JS, Jung BC, Lee HJ, Kim S, Masliah E, Sardi PS, Lee SJ. (2014).Glucocerebrosidase depletion enhances cell-to-cell transmisión of α-synuclein. Nature Communications. 5,4755.

57. Usenovic M, Tresse E, Mazzulli JR, Taylor JP, Krainc D. (2012). Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, α-synuclein accumulation and neurotoxicity. Journal of Neuroscience. 32(12), 4240-4246.

58. Dehay B, Ramírez A, Martinez-Vicente M, Perier C, Canron MH, Doudnikoff E, Vital A, Vila M, Klein C, Bezard E. (2012). Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. PNAS. 109 (24), 9611-9616.

59. Suzuki K, Iseki E, Katsuse O, Yamaguchi A, Katsuyama K, Aoki I, Yamanaka S, Kosaka K. (2003). Neuronal accumulation of a-and b-synucleins in the brain of a GM2 gangliosidosis mouse model. Neuroreport. 14 (4), 551-554.

60. Roze E, Paschke E, Lopez N, Eck T, Yoshida K, Maurel-Ollivier A, Doummar D, Caillaud C, Galanaud D, Billette de Villemeur T, Vidailhet M, Roubergue A. (2005). Dystonia and Parkinsonism in GM1 Type 3 Gangliosidosis. Movement Disorders. 20, 1366-1369.

61. Suzuki K, Iseki E, Togo T, Yamaguchi A, Katsuse O, Katsuyama K, Kanzaki S, Shiozaki K, Kawanishi C, Yamashita S, Tanaka Y, Yamanaka S, Hirayasu Y. (2007). Neuronal and glial accumulation of alpha- and beta-synucleins in human lipidotes. Acta Neurophatologica. 114 (5),481-489.

62. Siintola E, Partanen S, Stromme P, Haapanen A, Haltia M, Maehlen J, Lehesjoki AE, Tyynela J. (2006). Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis. Brain. 129, 1438-1445.

63. Cullen V, Lindfors M, Ng J, Paetau A, Swinton E, Kolodziej P, Boston H, Saftig P, Woulfe J, Feany MB, Myllykangas L, Schlossmacher MG, Tyynelä J. (2009). Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo. Molecular Brain. 2, 5.

64. Chu Y, Dodiya H, Aebischer P, Olanow CW, Kordower JH. (2009). Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. Neurobiology of disease. 35 (3), 385-398.

65. Castro BM, Prieto M, Silva LC. (2014). Ceramide: A simple sphingolipid with unique biophysical properties.Progress in Lipid Research. 54, 53-67.

66. Yadav RS1, Tiwari NK. (2014). Lipid Integration in Neurodegeneration: An Overview of Alzheimer's Disease. Molecular Neurobiology. 50(1), 168-76.

67. Mielke MM, Maetzler W, Haughey NJ, Bandaru VV, Savica R, Deuschle C, Gasser T, Hauser AK, Gräber-Sultan S, Schleicher E, Berg D, Liepelt-Scarfone I. (2013). Plasma ceramide and glucosylceramide metabolism is altered in sporadic Parkinson's disease and associated with cognitive impairment: a pilot study. PLoS One. 8(9), e73094.

68. Farfel-Becker T, Vitner EB, Kelly SL, Bame JR, Duan J, Shinder V, Merrill AH Jr, Dobrenis K, Futerman AH. (2014). Neuronal accumulation of glucosylceramide in a mouse model of neuronopathic Gaucher disease leads to neurodegeneration. Human Molecular and Genetics. 23, 843-54.

69. Sun X, Marks DL, Park WD, Wheatley CL, Puri V, O'Brien JF, Kraft DL, Lundquist PA, Patterson MC, Pagano RE, Snow K. (2001). Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. American Journal of Human Genetics. 68(6), 1361-1372.

70. Kollmann K, Damme M, Markmann S, Morelle W, Schweizer M, Hermans-Borgmeyer I, Röchert AK, Pohl S, Lübke T, Michalski JC, Käkelä R, Walkley SU, Braulke T. (2012). Lysosomal dysfunction causes neurodegeneration in mucolipidosis II 'knock-in' mice. Brain. 135, 2661-2675.

Capítulo 6

¿Afecta el Cannabis a la Memoria y la Atención?

Robles-López E, Salinero-Bachiller M, Iribar MC, Peinado J

Resumen

Introduction: Delta9-tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) is the principal psychoactive component of cannabis sativa. Their neuropsychological effects are controversial. It has been reported that the use of cannabis produces neuroanatomic changes and damages brain functions such as memory or attention. On the other hand, there is also information that supports the idea of no harmful effect of cannabis abuse. The hypothesis of this study was to analyze if regular cannabis users present worse psychological performance than those who do not use cannabis, or those that do it occasionally. The objective was to check this hypothesis assessing memory and attention and analyzing THC in urine.

Methodology: The sample was formed by 66 participants aged between 18 and 34 years old (mean age = 23, 03±2, 672). The participants were divided in groups of cannabis, consumers, both regular and sporadic, and not consumers (controls). During the study, the regular consumers were segregated from those consumers who in addition to cannabis consumed other drugs. Of all the participants, 40 were men (27 consumers and 13 non-consumers) and 26 were women (14 consumers and 12 nonconsumers). Psychological performance was evaluated with two memory tests (WMS-III and Letters and Numbers) and two attention tests (Stroop and D2). In addition THC in urine was analyzed using the THC Flex® Reagent Cartridge.

Results: No significant differences were found for any of the psychological tests evaluated between users and controls. Only statistically different values were found between regular cannabis users and regular cannabis users who also consume other drugs, in the WMS-III Texts test. The analysis of THC levels in urine allows us to confirm that the study groups were properly structured.

Conclusions: Regular cannabis users do not present different cognitive, memory or attention performance than non-users.

Introducción

Según la última Encuesta Sobre Alcohol y Drogas en España, realizada en 2015 por el Ministerio de Sanidad (1), 2.940.000 personas habían consumido cannabis durante el año 2015. El número de personas entre los 15 y los 64 años que realizaron un consumo *problemático* del cannabis fue de 558.549, unas 100.000 personas menos que en 2013. Destaca que la mayor parte de este consumo se produjo entre los 15 y los 34 años, y que los hombres continúan siendo consumidores mayoritarios frente a las mujeres. Estas cifras indican que España está entre los países líderes en consumo de cannabis (junto con Reino Unido y Francia) dentro de la UE, de acuerdo con el informe anual del Observatorio Europeo de las Drogas de 2015 (2). Por otra parte, se ha descrito que el consumo de cannabis es percibido por la población como de bajo riesgo (3). Estos datos contrastan con los publicados por Font-Mayolas y colaboradores en 2006, que muestran que la percepción de riesgo entre los estudiantes españoles de 14-18 años se sitúa en un 38.8% en caso de consumo esporádico y en un 77.1% en caso de consumo habitual (4).

Cannabis sativa es una planta que contiene más de 60 cannabinoides diferentes. Su principal componente psicoactivo es el delta-9- tetrahidrocannabinol (Δ9-THC) (5), aislado por primera vez en 1964 por Yechiel Gaoni y Raphael Mechoulam (6, 7). El THC se encuentra en todas las partes de la planta, pero su concentración es mayor en las flores, las hojas y la resina (5, 7).

Más tarde se descubrió la existencia de receptores específicos para THC, los receptores cannabinoides (CB), tales como CB1 y CB2 (8).Posteriormente, se descubrieron una serie de compuestos endógenos que se fijaban a estos receptores, formando el sistema endocannabinoide (9). Este sistema presenta algunas diferencias en su funcionamiento respecto a otros neurotransmisores o neuromoduladores. Los precursores de los endocannabinoides se encuentran como parte de la membrana en la postsinapsis, por lo que no están preformados o almacenados en vesículas. Su síntesis y liberación tiene lugar de manera inmediata y su actuación es de tipo retrógrado: desde la post- a la presinápsis (9).

Los endocannabinoides mejor conocidos son la anandamida y el 2-araquidonilglicerol (8). Los receptores CB1 se encuentran localizados en el sistema nervioso central, especialmente en los ganglios basales, cortex frontal, hipocampo y cerebelo. También se encuentran, en menor densidad, en la sustancia gris periacueductal, amígdala, núcleo accumbens, tálamo y médula (8), además de encontrarse en células no neuronales del cerebro, como la microglía, oligodendrocitos y astrocitos (10). Por su parte, los receptores CB2 se encuentran principalmente en tejidos del sistema inmunitario y en células inflamatorias (8), pero también se han encontrado en neuronas del cortex cerebral, hipocampo, amígdala, hipotálamo y cerebelo (11). Este sistema actúa como neuromodulador de sinapsis excitatorias y sobre todo inhibitorias en diferentes regiones cerebrales, destacando las implicadas en el comportamiento emocional, dolor (12) o control de la ingesta (13).

- **Efectos del consumo de cannabis**

Los efectos que el consumo de cannabis (THC) presenta sobre el sistema nervioso central están modulados principalmente por el receptor CB1 (14). No obstante sus efectos fisio-psicológicos están sujetos a controversia en la literatura científica. Algunos autores (15) han demostrado que cuanto mayor es la dosis y más temprana es la edad de inicio del consumo, mayor probabilidad hay de padecer alteraciones neuroanatómicas, como la reducción de volumen y densidad de materia gris en ciertas regiones cerebrales, especialmente en el hipocampo (que presenta una alta densidad de receptores cannabinoides), amígdala, estriado y corteza prefrontal (15,16). Sin embargo, hay estudios de neuroimagen que no muestran diferencias significativas entre consumidores de cannabis y controles. Así, en un estudio realizado por Jager, y colaboradores en 2007 (16), no se encontraron diferencias significativas entre consumidores de cannabis y controles en cuanto a densidad de materia gris o blanca en el hipocampo, ni se encontró correlación entre los niveles de materia gris hipocampal y los resultados obtenidos en una tarea de memoria asociativa llamada PMP.

Los efectos psicológicos del consumo continuado de cannabis están también sujetos a debate en la literatura científica, particularmente cuando se trata de funciones como la atención y la memoria (14). Por una parte se ha descrito una

disminución de la memoria inmediata, relajación, desorientación o alteraciones perceptivas, entre otros efectos (7). Estos resultados sobre atención y memoria han sido confirmados en consumidores crónicos de cannabis (17,18, 19, 20,21), e incluso tras un tiempo de abstinencia (19). Por ejemplo, un estudio realizado por Cohen y colaboradores en 2017 (17), donde los participantes realizaron la prueba Stroop, que mide el grado de inhibición cognitiva y atención, demuestra que los consumidores de cannabis presentan tiempos de reacción significativamente mayores para estímulos incongruentes que para estímulos congruentes, lo que podría indicar que los consumidores de cannabis son más susceptibles a sufrir interferencias atencionales que los no consumidores. Sin embargo, otros estudios (22), empleando la tarea de interferencia Multi-SourceInterferenceTask (MSIT), en la que los participantes observaban estímulos que consistían en tres números o tríos (de 0 a 3) presentados horizontalmente, donde uno de los números era el objetivo y los otros dos distractores, concluyen que aunque el consumo de cannabis a largo plazo se asocia a una conectividad funcional mayor entre regiones de la corteza frontal y la corteza occipitoparietal, no hubo diferencias evidentes en el rendimiento cognitivo de atención (inhibición cognitiva, etc.) entre consumidores habituales y no consumidores de cannabis. En otra reciente revisión realizada por Lorenzetti y colaboradores en 2016 (15) sobre los efectos del cannabis en la adolescencia, se encontró que en la mayoría de los 13 estudios revisados, la memoria de trabajo estaba alterada, sobre todo cuando el consumo era habitual. Sin embargo, el rendimiento cognitivo de los participantes era normal.

La información de todos estos estudios, aunque es contradictoria, anima a seguir explorando los efectos y consecuencias del cannabis, así como su implicación en posibles terapias para mejorar la función cognitiva.

En relación con todo lo anterior, nos preguntamos si realmente hay un deterioro neuropsicológico generalizado en el grupo de consumidores habituales de cannabis, o si por el contrario, dicho consumo no tiene por qué causar un deterioro cognitivo significativo. Por tanto, la hipótesis de este estudio es que los consumidores habituales de cannabis no presentan un rendimiento neuropsicológico peor que aquellos que no consumen cannabis, o que lo hacen de forma ocasional.

Por tanto, los objetivos del presente estudio son: 1) Valorar los efectos del consumo esporádico y habitual de cannabis sobre la memoria mediante el empleo del test textos WMS-III y el test de letras y números; 2) Valorar los efectos del consumo esporádico y habitual de cannabis sobre la atención mediante el empleo del test D2 y la tarea Stroop; 3) Confirmar el consumo esporádico o habitual mediante el análisis de THC en orina.

Materiales y Métodos

- **Diseño del estudio**

La muestra estuvo formada por 66 participantes, con edades comprendidas entre 18 y 34 años (media de edad =23,03±2,672), consumidores de cannabis, tanto de forma habitual como esporádica, y por jóvenes no consumidores de cannabis, que actúan como controles. De todos los participantes, 40 fueron hombres (27 consumidores y 13 no consumidores) y 26 fueron mujeres (14 consumidoras y 12 no consumidoras). Los participantes se distribuyeron, inicialmente, en los siguientes grupos de acuerdo con la clasificación realizada por Desrosiers y cols. en 2015 (23): Grupo 1 (Control/No consumidores) compuesto por 25 participantes; Grupo 2 (Consumo esporádico: menos de 2 veces por semana) con 8 participantes; y Grupo 3 (Consumo habitual: 4 o más veces a la semana), con 24 participantes. A lo largo del desarrollo del estudio, encontramos jóvenes que además de ser consumidores habituales de cannabis, consumían otro tipo de drogas, por lo que añadimos un cuarto grupo de consumidores habituales de cannabis que toman, además, otras drogas, compuesto por 9 participantes.

Para realizar esta clasificación de los participantes se ha utilizado la "*evaluación de los patrones de consumode cannabis"* (4) incluida dentro del cuestionario sociodemográfico. Algunas de las preguntas empleadas por Font-Mayolas y cols., han sido modificadas para adaptarlas mejor a este estudio. El reclutamiento de participantes se llevó a cabo en diversas Facultades de la UGR (alumnos de grado y posgrado).

1. Criterios de inclusión y exclusión

Se establecieron los siguientes **criterios generales** de inclusión y exclusión para todos los grupos de estudio.

Inclusión:

- Firmar el consentimiento informado y
- Tener una edad comprendida entre 18-34 años.

Exclusión:

- Padecer alguna enfermedad o trastorno psicológico en el momento del estudio
- Tomar medicación psicoactiva que pudiera interferir con los efectos del consumo de cannabis.

Además, para cada grupo se establecieron una serie de **criterios específicos** de inclusión y exclusión: grupo 1 (no consumidores): no haber consumido cannabis en el último año, ni haber consumido otro tipo de drogas (salvo alcohol);Grupo 2(consumidores esporádicos): consumir cannabis menos de 2 veces por semana y no consumir otro tipo de drogas excepto alcohol; Grupo 3 (consumidores habituales): consumir cannabis 2 o más veces por semana, y no consumir otro tipo de drogas (excepto alcohol); Grupo 4 (consumidores habituales + otras drogas): consumir cannabis 2 o más veces a la semana y consumir algún otro tipo de droga más de 2 veces en los últimos 6 meses.

a. Ética y conflicto de intereses

La participación en este estudio fue voluntaria, anónima y desinteresada. No existió conflicto de intereses por parte de ningún miembro del equipo investigador. El presente estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Granada.

b. Método

i. Variables sociodemográficas

Se ha creado para la ocasión una hoja de valoración de variables sociodemográficas con las que poder obtener la información precisa para conocer aspectos relevantes de la situación personal y social de cada sujeto.

ii. Pruebas de evaluación psicológica

La evaluación psicológica incluyó la evaluación de la atención (selectiva y sostenida, e inhibición cognitiva) y la memoria (verbal a corto plazo y de trabajo).

- **Atención**

1. *Versión validada y baremada del* ***test D2***, creado por Rolf Brickenkamp y Zillmer (1981) para evaluar la **atención selectiva y sostenida y la concentración mental**. Puede aplicarse de manera individual y colectiva a partir de los 12 años. Es un test de tiempo limitado (20 segundos/fila) que mide la velocidad de procesamiento, el seguimiento de instrucciones y la capacidad de ejecución en una tarea de discriminación de estímulos visuales similares. El tiempo de aplicación de esta prueba es de alrededor de 10 minutos. La tarea que se le presenta al sujeto consta de 685 estímulos, que están distribuidos en 14 líneas con 47 estímulos cada una de ellas. El tiempo del que se dispone para cada línea es de 20 segundos. Los estímulos son caracteres (letras 'd' ó 'p') que vienen con una o dos pequeñas líneas situadas, individualmente o en pareja, en la parte superior o inferior de cada letra. Lo que se le pide al sujeto es revisar atentamente, de izquierda a derecha, el contenido de cada línea y marcar toda letra "d" que tenga dos pequeñas líneas, bien las dos arriba, las dos debajo o una arriba y otra debajo. Esta prueba da dos puntuaciones: la puntuación T total, es decir, los aciertos conseguidos en la prueba, que indica la atención selectiva y sostenida; y el índice de concentración, que se halla restándole al número total de aciertos, el número de veces que se marcó una letra que no era la adecuada.

2. *Versión validada y baremada del* ***test Stroop*****,** creada por Stroop en 1935, que consiste en una prueba atencional que se encarga de evaluarla **atención selectiva, memoria de trabajo y flexibilidad e inhibición cognitivas**. Se aplica de manera individual, de los 7 a los 80 años. El tiempo de aplicación es de 5 minutos aproximadamente. La prueba consiste en tres tareas: Lectura de palabras, denominación de colores y una última tarea de interferencia, en la que hay que atender al color de la letra intentando que no interfiera el significado de la palabra**.** La comparación de las puntuaciones obtenidas en las tres tareas permite evaluar los efectos de la interferencia en el sujeto y su capacidad de control atencional. La sencillez de los estímulos y su breve tiempo de aplicación permiten usar esta prueba en casos muy diversos (daños cerebrales, abuso de sustancias, demencia, psicopatología, estrés, etc.), independientemente del nivel cultural del sujeto.

- **Memoria**

1. *Versión validada y baremada del subtest "**Textos WMS-III**",* un subtest de la escala de memoria creada por Wechsler (1999), que evalúa la **memoria auditiva a corto plazo**. Estudia el recuerdo inmediato de ideas verbales a partir de dos textos que son leídos al sujeto. El primer texto contiene 24 unidades de memoria o "ideas", y el segundo texto, 22 unidades. El paciente recibe un punto por cada "idea" que recuerde. La puntuación total será el número de ideas recordadas en cada texto.

2. *Versión validada y baremada del **test "Números y Letras"***, de la escala Wechsler (1999), que mide esencialmente la **memoria auditiva acorto plazo, la memoria de trabajo, el manejo de información mental, la formación de secuencias y la imaginación visuo-espacial**. En esta prueba, se parte de una serie de números y letras mezclados entre sí. El sujeto, tras la lectura de estos caracteres por el examinador, debe repetir la serie completa teniendo en cuenta que debe ordenar en primer lugar los números, y seguidamente las letras por orden alfabético. Esto pone en evidencia fundamentalmente su capacidad de memoria de trabajo.

iii. Determinación de THC

Para el análisis del THC se emplearon cartuchos de reactivos de THC Flex® utilizados en el sistema de química clínica Dimension®. Este sistema proporciona los reactivos necesarios en una prueba de diagnóstico *in vitro* para determinar de forma cualitativa y semicuantitativa la presencia de cannabinoides en orina humana. El cartucho de reactivos de THC Flex® contiene los reactivos Syva® Emit® II Plus. Esta metodología emplea lotes coincidentes de anticuerpos monoclonales reactivos a Δ9-tetrahidrocannabinol marcados con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La concentración de droga de la muestra determina la cantidad de conjugado de THC-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (THC-G6PDH) que se une al anticuerpo. El conjugado no unido cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato, con la reducción simultánea de NAD+ a NADH, con mayor rapidez que el conjugado unido. La velocidad de aumento de la absorbancia a 340nm debida al aumento de NADH está relacionada con la concentración de la droga en la muestra. Los resultados de un análisis de THC se pueden registrar de forma semicuantitativa mediante un valor numérico, seguido de una designación positiva o negativa. Este

valor numérico no tiene unidades y debe considerarse solo indicativo de la concentración de THC en orina. Los resultados de THC iguales o superiores a 1000 se registrarán como positivos, y los inferiores, como negativos.

Diariamente se evalúan controles negativos cuyo resultado debe ser siempre inferior a 1000 y controles positivos (75ng/dl de 11-nor- Δ9-THC- 9-carboxilic acid) cuyo resultado debe ser superior a 1000.

Resultados

- **Evaluación de los valores de THC en orina**

El análisis de las muestras de orina en los distintos grupos estudiados muestra que el 100% de los no consumidores y el 88% de los consumidores ocasionales dan negativo en el test de determinación de THC. Por el contrario, el 92% de los consumidores habituales y el 100% de los consumidores habituales que ademásconsumen otras drogan muestran resultados positivos en la prueba de THC (Figura 1). El estudio semicuantitativo del nivel de THC en las muestras de orina refleja que los valores del grupo de consumidores habituales que también toman otras drogas, son superiores a los del grupo de consumidores habituales, aunque no significativamente. Ambos grupos se encuentran por encima del nivel considerado como positivo en THC (1000). Los otros dos grupos de estudio se encuentran por debajo de este valor, considerándose como negativo para THC (Figura 2).

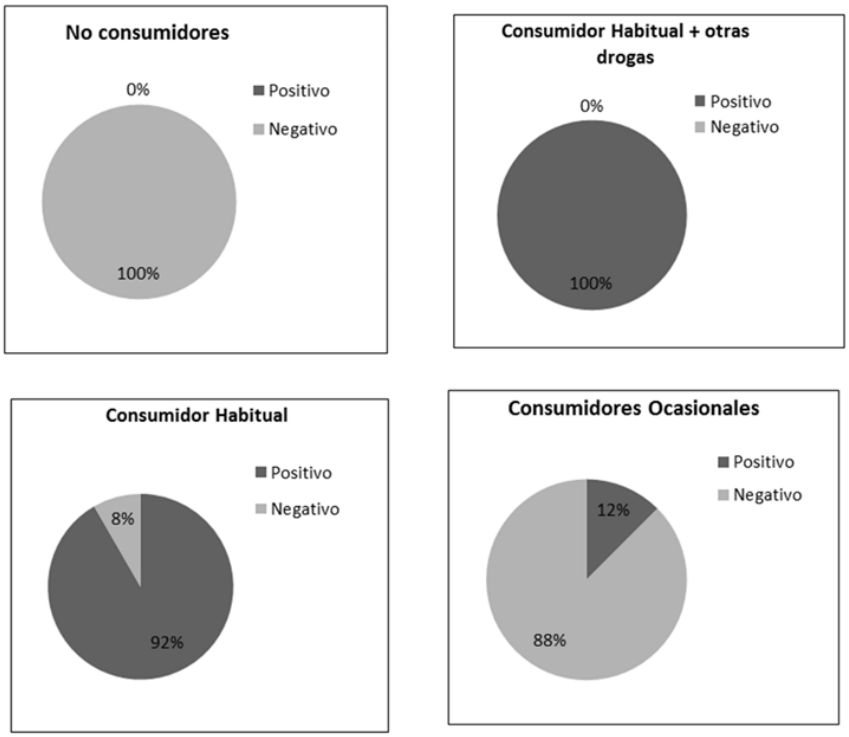


Fig 1. Descripción cualitativa de los resultados de THC en los diferentes grupos de estudio.

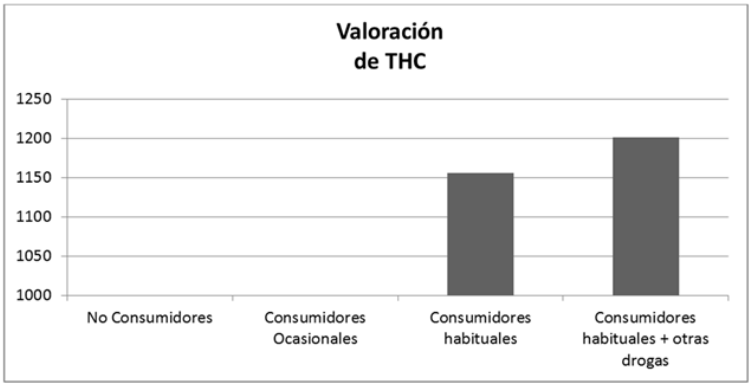


Fig 2. Representación de la media de los datos semicuantitativos de THC en la orina de los diferentes grupos de estudio.

- **Evaluación neuropsicológica de la atención y memoria**

Los resultados obtenidos en la evaluación psicológica de la memoria y atención se muestran en la Figura 3. Por una parte, la valoración de la atención sostenida y selectiva y de la concentración mental, mediante la prueba atencional D2, no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados, al igual que la evaluación mediante la tarea Stroop de la atención selectiva, la flexibilidad e inhibición cognitivas. Por otra parte, la evaluación de la memoria auditiva a corto plazo mediante el test textos WMS-III, no mostró diferencias significativas entre el

grupo de no consumidores, el de consumidores ocasionales y el de consumidores habituales. Sin embargo, los consumidores habituales tienen resultados superiores al resto, siendo significativamente diferentes de los obtenidos por el grupo de consumidores habituales que consumen otras drogas (p=0.017). Por último, la evaluación de la memoria auditiva a corto plazo y de la memoria de trabajo, mediante la prueba de Letras y Números, tampoco mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos. En la tabla 1 se muestra la correlación de las pruebas psicológicas entre sí, con el fin establecer si su uso es apropiado para evaluar la atención y la memoria en este estudio. Puede observarse que existe correlación entre el rendimiento en la prueba D2 (tanto en concentración como en atención selectiva y sostenida) y el rendimiento en las otras tres pruebas. También se observa correlación entre el rendimiento en la prueba Stroop y el rendimiento en la prueba de Letras y Números.

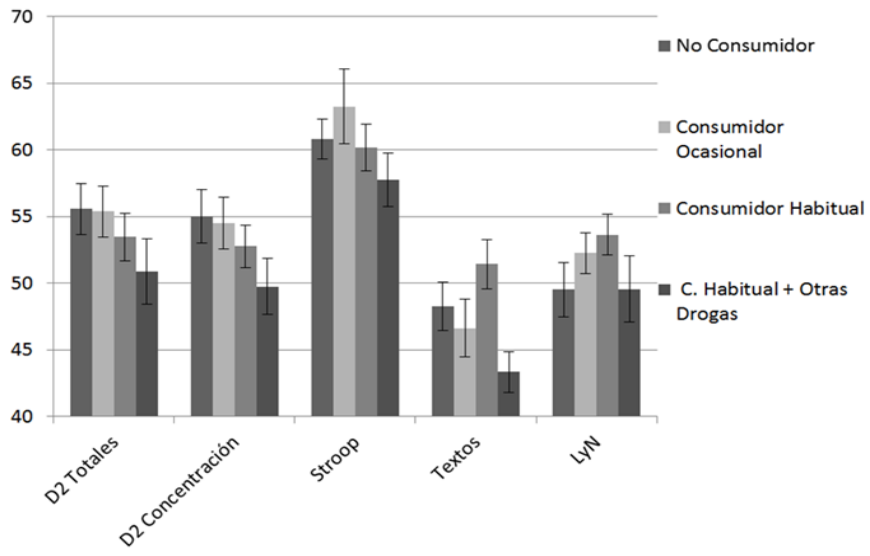


Fig 3. Descripción de la evaluación neuropsicológica de los diferentes grupos de estudio en las pruebas analizadas.

Tabla 1. Correlación de las pruebas psicológicas entre sí. En azul se encuentra marcada la prueba D2, que correlaciona con el resto de pruebas.

	LyN	Stroop	D2 Concentración	D2 Totales	Textos
LYN	1 66				
Stroop	0,375 0,002* 66	1 66			
D2 Concentración	0,316 0,010* 65	0,371 0,002* 65	1 65		
D2 Totales	0,283 0,023* 65	0,315 0,011* 65	0,952 0,000* 65	1 65	
Textos	0,176 0,157 66	-0,056 0,655 66	0,294 0,018* 66	0,255 0,040* 66	1 66

Discusión

Existe controversia en la literatura sobre los efectos neuropsicológicos del consumo de cannabis (24). En el presente estudio hemos valorado los efectos sobre memoria y atención, tanto del consumo esporádico como del consumo habitual, en el grupo de edad en el que se sitúa el mayor porcentaje de consumidores en nuestro país.

- **Sobre la evaluación de THC**

Uno de los modos más extendidos de consumo de marihuana es por inhalación del humo. Por esta vía, la absorción del THC es rápida, y la cantidad absorbida dependerá de la manera en la que se consuma (25). Una vez inhalado, pasa a la sangre, donde es metabolizado. El THC es una sustancia altamente liposoluble que accede con facilidad al cerebro, y al unirse a los receptores cannabinoides, afecta a los procesos neurológicos de ciertas áreas cerebrales. El THC y sus metabolitos se excretan principalmente por la bilis y las heces (65-70%); el resto se elimina por la orina. La eliminación urinaria tiene mayor importancia en consumidores crónicos, siendo los metabolitos urinarios fundamentalmente ácidos, como el THC-COOH (26). Esta sustancia se utiliza habitualmente como marcador biológico de consumo.

Nuestros resultados en la valoración de THC se basan en un análisis semicuantitativo de las muestras de orina obtenidas de cada participante, designándose positivo o negativo en función de un valor numérico (1000). Valores

por encima de 1000 se consideran positivos y por debajo de dicha cifra, negativos. Nuestros resultados fueron positivos para los consumidores habituales y los consumidores habituales que además consumen otras drogas, siendo mayores en este último grupo. Esto es lógico si se tiene en cuenta que cuanto mayor es la cantidad de consumo de cannabis, mayor cantidad de THC que se elimina por la orina y se puede detectar en el análisis. En el caso de los no consumidores, no se detectó THC en orina (valores por debajo de 1000), por lo que fueron designados como negativos; y en el caso de los consumidores ocasionales, en general, la cantidad de THC que pudiesen presentar no ha sido suficiente para poder considerarlos como positivos, bien porque la cantidad consumida fuese pequeña o bien porque el tiempo transcurrido sin consumir fuese el suficiente como para poder eliminar el THC. En cualquier caso, como se muestra en la figura 2, nuestros consumidores y controles estaban bien definidos y mostraron una valoración de THC en orina congruente con su clasificación.

- **Sobre la evaluación psicológica de la atención y la memoria**

No se han encontrado diferencias significativas en los parámetros psicológicos evaluados de atención y memoria entre consumidores (ya sean esporádicos o habituales) y no consumidores. Solamente los consumidores habituales mostraron resultados estadísticamente diferentes a los consumidores de cannabis de manera habitual, además de otras drogas, en el test de Textos WMS-III, exclusivamente. Esta falta de modificación de parámetros cognitivos podría explicarse señalando la existencia de mecanismos cerebrales compensatorios, de manera que los consumidores de cannabis emplearían mecanismos cerebrales diferentes a los que emplean las personas que no consumen, o simplemente emplearían el mismo mecanismo de manera diferente para lograr un rendimiento similar (15,22). Así, se ha descrito (27) que los consumidores de cannabis presentan una reducción de la activación en la corteza parietal derecha, en las cortezas prefrontales mediales y dorsales y en la corteza medial cerebelosa, al mismo tiempo que un aumento en la activación de varias regiones de la corteza parietal posterior, frontal, occipital y del cerebelo, en comparación con los no consumidores de cannabis, que presentan una activación normal de dichas zonas. De esta forma, el rendimiento psicológico entre consumidores y controles resultó similar en pruebas de atención y memoria, como la de Letras y Números (27). Este puede ser uno de los motivos por el cual ciertos

estudios (28, 29, 24), al igual que el nuestro, no han encontrado diferencias significativas en el rendimiento en las pruebas de atención y memoria entre consumidores habituales de cannabis y no consumidores. En nuestro estudio puede observarse que, en las pruebas de atención, a medida que el consumo de cannabis va incrementándose, los valores medios obtenidos en las pruebas van siendo cada vez ligeramente menores. Se ha demostrado que el uso continuado de cannabis produce daños en el tejido cerebral, que a su vez, originan deficiencias en la atención, percepción, resolución de problemas, etc. (30) lo que daría una cierta consistencia a nuestros resultados, preliminares ya que el tamaño de muestra es aún pequeño.

En cuanto a la memoria, tampoco se han encontrado diferencias significativas en las pruebas utilizadas para su evaluación (Textos WAIS y Letras y Números), entre los no consumidores de cannabis con ninguno de los otros tres grupos de estudio. Sin embargo, nuestros datos mostraron que en la evaluación de estas dos pruebas, los consumidores habituales de cannabis presentan puntuaciones superiores, aunque sin significación estadística, a los no consumidores. Esto puede tener su explicación ya que, aunque algunos estudios muestran que el consumo del cannabis se relaciona con una grave afección de la memoria y otras funciones cognitivas (31), resultados más novedosos muestran un incremento en el *priming* automático en los consumidores de cannabis respecto a los no consumidores, que es un efecto relacionado con la memoria implícita por el cual la exposición a determinados estímulos influye en la respuesta que se da a estímulos presentados con posterioridad (32). Además, nuestros resultados en la evaluación de la memoria mostraron, en la prueba Textos WAIS, diferencias estadísticas entre los consumidores habituales de cannabis y los consumidores de cannabis más otras drogas, presentando estos últimos una puntuación significativamente menor a los primeros. Esto, junto con el hecho de que los consumidores habituales de cannabis no presentaran diferencias significativas ni con los consumidores ocasionales ni con los no consumidores, nos hace pensar que la puntuación inferior en esta prueba, en aquellos que además consumen otras drogas, podría deberse precisamente al consumo de estas sustancias, y no al de cannabis. De hecho, diversos estudios han puesto de manifiesto que los consumidores habituales de

drogas como la cocaína, presentan déficits en la memoria, tanto a corto como a largo plazo, así como en la memoria de trabajo (33, 34).

Por otra parte, nuestros resultados tampoco reflejan correlaciones significativas entre el tiempo de consumo y el posible declive psicológico. Esto puede deberse a que el tiempo de consumo de nuestra muestra (4-6 años) no es el suficiente como para poder establecer esta correlación. Otros autores (19), ampliaron el tiempo de consumo a 38 años, dando tiempo a los participantes a desarrollar un patrón de consumo persistente. Sus resultados mostraron que el uso continuado de cannabis se asociaba con el declive neuropsicológico en general, aun teniendo controlado el nivel educativo. Además, tampoco se ha encontrado una correlación entre el rendimiento de las pruebas psicológicas de los participantes que consumen habitualmente con la edad de inicio de consumo, cosa que sí han podido demostrar otros estudios (35); y debido a que la mayoría de participantes han sido universitarios, tampoco hemos podido establecer una relación entre los resultados obtenidos en las pruebas psicológicas y el nivel de estudios, aunque se ha observado una ligera tendencia a conseguir un rendimiento mayor a medida que el nivel de estudios aumenta.

Por último, nuestros resultados confirman la relación existente entre las pruebas psicológicas realizadas, especialmente para la prueba D2, que ya se ha demostrado que es una de las más indicadas para detectar déficits de atención en niños con posible diagnóstico de TDAH (36). Cabe destacar que estudios genéticos recientes parecen indicar la existencia de una posible relación entre genes, tendencia al abuso de sustancias psicoactivas y rendimiento cognitivo (14), por lo que los procesos de atención y memoria, al implicar multitud de variables tanto biológicas como psicosociales, son difíciles de relacionar directamente con el consumo de cannabis.

- **Limitaciones del estudio**

El estudio que aquí se presenta tiene una limitación determinante en el número de participantes reclutados. Es posible que resultados que muestran tendencias sin significación estadística, pudieran demostrarse como estadísticamente significativos si se ampliara la n muestral. Además, el tiempo medio de consumo de nuestra población de estudio es corto, y sería necesario ampliarlo para dar consistencia a nuestros resultados.

Conclusiones

Nuestros resultados, por una parte, corroboran la adecuada estructuración de los participantes en los diferentes grupos de estudio. Por otra parte, no se han encontrado diferencias significativas en los parámetros psicológicos de atención y memoria evaluados entre consumidores, ya sean esporádicos o habituales, y no consumidores. Solamente los consumidores habituales mostraron resultados estadísticamente diferentes a aquellos que consumían cannabis más de otras drogas en memoria verbal a corto plazo evaluada por el test de Textos WMS-III.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Antonio Plá y al Hospital Campus de la Salud su colaboración en el análisis de THC.

Bibliografía:

1. Encuesta Sobre Alcohol y Drogas en España (2015). Ministerio de Sanidad. Http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformación/encuestas.htm. (Última visita 05/09/2017).

2. Informe anual del Observatorio Europeo de las Drogas (2015). http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/home.htm. (Última visita 05/09/2017).

3. Calafat A, Fernández C, Becoña E, Gil E, Juan M Torres MA (2000a). Consumo y consumidores de cannabis en la vida recreativa. Adicciones 12.

4. Font-Mayolas S, Gras ME, Planes M. (2006). Análisis del patrón de consumo de cannabis en estudiantes universitarios. Adicciones, 18, 4, 337- 344.

5. Carod FJ. (2005). Síndromes neurológicos asociados con el consumo de hongos y plantas alucinógenas. Elementos, 60, 49-57.

6. Mechoulam R. (2002). Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their posible roles in neuroprotection and aggression. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids, 66,93-99.

7. González R. (2007). Acute and non acute effects of cannabis on brain functioning and neuropsychological performance. Neuropsychology Review, 17(3):347-61.

8. Micale V, Di Marzo V, Sulcova A, Wotjak CT, Drago F. (2013). Endocannabinoid system and mood disorders: priming a target for new therapies. Pharmacology & Therapeutics. 138 (1):18-37.

9. Grotenhermen F. (2006). Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. Cannabinoids. 1(1):10-14.

10. Mackie K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system .Handb Exp Pharmacol. (168):299-325.

11. Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. Brain Res. 1071(1):10–23

12. Starowicz K, Finn DP. (2017). Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action Advances in Pharmacology. 80, 437-475.

13. Lau BK, Cota D, Cristino L, Borgland SL. (2017). Endocannabinoid modulation of homeostatic and non-homeostatic feeding circuits. Neuropharmacology, 124, 38-51.

14. Colizzi M, Fazio L, Ferranti L, Porcelli A, Masellis R, Marvulli D, Bonvino A, Ursini G, Blasi G, Bertolino A. (2015). Functional genetic variation of the cannabinoid Receptor I and cannabis use interact on prefrontal connectivity and related working memory behavior. Neuropsychopharmacology. 40, 640- 649.

15. Lorenzetti V, Alonso-Lana S, Youssef GJ, Verdejo-Garcia A, Suo C, Cousijn J, Takagi M, Yucel M, Solowij N. (2016). Adolescent cannabis use: what is the evidence for functional brain alteration?. Current Pharmaceutical Design, 22 (42), 6353-6365.

16. Jager G, de Win M, van den Brink W, Ramsey NF. (2007). Effects of frequent cannabis use on hippocampal activity during an associative memory task. European Neuropsycho pharmacology, 17 (4): 289-297.

17. Cohen K, Kapitány-Fövény M, Mama Y, Arieli M, Rosca P, Demetrovics Z, Weinstein A. (2017). The effects of synthetic cannabinoids on executive function. Psychopharmacology 234: 1121.

18. Ashton CH. (2001). Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. British Journal of Psychiatry, 178, 101-106.

19. Meier MH, Caspi A, Ambler A, Harrington H, Houts R, Keefe RS, McDonald K, Ward A, Poulton R, Moffitt TE. (2012). Persistent cannabis users show neuropsychological decline from childhood to midlife. PNAS, 109, 40.

20. Fridberg DJ, Queller S, Ahn W, Kim W, Bishara AJ, Busemeyer JR, Porrino L, Stout JC. (2010). Cognitive mechanisms underlying risky decisión-making in chronic cannabis users. J MathPsychol. 1; 54 (1): 28-38.

21. Bartholomew J, Heffernan TM. (2010). Does cannabis use affect prospective memory in young adults? Journal of Psychopharmacoloy. 24 (2), 241-246.

22. Harding IH, Solowij N, Harrison B J, Takagi M, Lorenzetti V, Lubman D I, Seal ML, Pantelis C, Yücel M. (2012). Functional connectivity in brain networks underlying cognitive control in chronic cannabis users. Neuropsychopharmacology. 37, 1923-1933.

23. Desrosiers N, Ramaekers JG, Chauchard E, Gorelick DA, Huestis MA. (2015). Smoked cannabis´ Psychomotor and neurocognitive effects in occasional and frequent smokers. Journal of Analytical Toxicology. 39, 251-262.

24. Batalla A, Bhattacharyya S, Yücel M, Fusar-Poli P, Crippa JA, Nogué S, Torrens M, Pujol J, Farré M, Martin-Santos R. (2013). Structural and Functional Imaging Studies in Chronic Cannabis Users: A Systematic Review of Adolescent and Adult Findings. PLoS ONE, 8(2): e55821.

25. Torres G, Fiestas F. (2012). Efectos de la marihuana en la cognición: una revisión desde la perspectiva neurobiológica. Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 29 (1), 127-134.

26. Adams BI, Martin RB. (1996). Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. Addiction. 91(11) 1585-1614.

27. Chang L, Yakupov R, Cloak C, Ernst T. (2006). Marijuana use is associated with a reorganized visual attention network and cerebellar hypoactivation. Brain. 129, 1096-1112.

28. Kanayama G, Rogowska J, Pope HG, Gruber SA, Yugerlun-Todd DA. (2004). Spatial working memory in heavy cannabis users: a functional magnetic resonance imaging study. Psychopharmacology. 176: 239-247.

29. Cousijn J, Vingerhoets WA, Koenders L, de Haan L, van der Brink W, Wiers R, Goudriaan A E. (2013). Relationship between working-memory network function and substance use: a 3-year longitudinal fMRI study in heavy cannabis users and controls. Addiction Biology. 19, 282-293.

30. Yücel M, Solowji N, Respondeck C, Whitlle S, Fornito A, Pantelis Ch, Lubman DI. (2008). Regional brain abnormalities associated with long-term heavy cannabis use. Archives of General Psychiatry, 65(6): 694-701.

31. Becker B, Wagner D, Gouzoulis- Mayfrank E, Spuentrup E, Daumann J. (2010). The Impact of early-onset cannabis use on functional brain correlates of working memory. Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry. 34, 837-845.

32. Morgan C, Rothwell E, Atkinson H, Mson O, Curran HV. (2010). Hyperpriming in cannabis users: A naturalistic study of the effects of cannabis on semantic memory function. PsychiatryResearch. 176, 213-218.

33. Fox HC, Jackson ED, Sinha R. (2009). Elevated cortisol and learning and memory deficits in cocaine dependent individuals: relationship to relapse outcomes. Psychoneuroendocrinology, 34, 1198- 1207.

34. Spronk DB, van Wel JH, Ramaekers JG, Verkes RJ. (2013). Characterizing the cognitive effects of cocaine: a comprehensive review. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 37 (8), 1838-1859.

35. Lopez-Larson M P, Bogorodzki P, Rogowska J, McGlade E, King JB, Terry J, Yurgelun-Todd D. (2011). Altered prefrontal and insular cortical thickness in adolescent marijuana users. BehavBrain Res. 220 (1): 164-172.

36. Álvarez Mª J. (2012). Detección precoz de TDAH en Pediatría de Atención Primaria. VI Jornada de Actualización en Psiquiatría Infantil y Adolescente, Pamplona.

Capítulo 7

Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo: obtención, diferenciación y aplicación en lesiones cerebrales y medulares

Hernández R, Jiménez-Luna C, Cabeza L, Caba O, Prados JC, Melguizo C.

Resumen

En las últimas décadas, las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo se han postulado como una estrategia terapéutica atractiva para la aplicación de la medicina regenerativa a las diferentes patologías que afectan al sistema nervioso. Su alto rendimiento en los procesos de aislamiento celular, su elevada plasticidad para diferenciarse tanto in vitro como in vivo a tipos celulares no mesodérmicos entre los que se encuentran los de linaje neuronal y su baja inmunogenicidad, se presentan como ventajas para su posible uso en trasplantes alogénicos. Numerosos estudios preclínicos y clínicos han demostrado evidentes mejoras funcionales en modelos animales de enfermedades del sistema nervioso tras el trasplante de células madre mesenquimales. De hecho, actualmente existen numerosos ensayos clínicos en proceso que van a permitir evaluar los posibles beneficios que la terapia basada en este tipo celular puede aportar a pacientes con daños neurológicos y sus limitaciones en la aplicación clínica. En esta revisión, analizamos el potencial de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo como herramienta terapéutica en enfermedades del sistema nervioso, mostrando especial atención a las lesiones cerebrales ocasionadas por traumatismo o infarto cerebral y a las lesiones medulares.

Introducción

El descubrimiento y la manipulación de las células madre, células indiferenciadas presentes en todos los organismos multicelulares y que tienen la capacidad de autoperpetuarse y diferenciarse hacia distintos tipos celulares (1, 2), ha sido la clave que ha permitido que la denominada "medicina regenerativa" sea vista como una posibilidad terapéutica real para una gran cantidad de patologías, incluidas las que afectan al sistema nervioso (SN). Este sistema posee una baja capacidad de regeneración espontánea después de una enfermedad o lesión, lo que hace necesario el desarrollo de novedosas estrategias para promover su reparación funcional y tisular. En los últimos años, la obtención de células de estirpe neuronal y glial a partir de diferentes tipos de células madre, tales como las células madre embrionarias (ESC), las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) o las células madre mesenquimales (MSC), ha sido exitosa. Los ensayos de regeneración tisular utilizando la administración de células y/o fármacos han aportado resultados prometedores en animales de experimentación, aunque su traslado al campo clínico no ha sido todo lo satisfactorio que se esperaba (3).

Esto se debe a que son todavía muchos los obstáculos que impiden aplicar de una forma eficaz esta nueva terapia, como la dificultad para generar la cantidad y los tipos celulares específicos que se necesitan en ciertas patologías, la necesidad de asegurar que no se desarrollen tumores después del injerto o la falta de predicción respecto a la recuperación funcional a partir del tejido implantado. A estos factores hay que sumar la reducida integración y/o supervivencia de las células utilizadas en el tejido dañado y los problemas derivados de su forma de administración incluido el factor limitante que supone la existencia de una barrera hematoencefálica. No obstante, existe un progreso continuo en la investigación básica y clínica con células madre aplicadas al SN que hace prever el exitoso desarrollo de estrategias terapéuticas que definitivamente puedan ser aplicadas a los pacientes. De hecho, diferentes ensayos clínicos con células madre ya han comenzado para varias enfermedades neurológicas (lesión de médula espinal, degeneración macular, etc). De los resultados de estos estudios y de los que se están diseñando para otras patologías se obtendrán datos sobre los criterios y el control de calidad de las células del donante y la evolución y eficacia de los injertos (4).

Son muchas los tipos de células madre utilizadas en medicina regenerativa en general y en su aplicación para patologías del SN en particular. Las células madre con distintos orígenes presentan similitudes en muchos aspectos, pero también poseen diferentes propiedades en cuanto a su tasa de diferenciación, secreción de factores tróficos o comportamiento en un ambiente patológico, que las hacen adecuadas para diferentes finalidades. En general, las células madre se clasifican de acuerdo a dos criterios, potencialidad (Figura 1) y origen (Figura 2) (5). En relación a la potencialidad o capacidad de diferenciación hacia otros tipos celulares, podemos distinguir entre: i) *células madre totipotentes*, capaces de generar todos los tipos celulares, tanto los componentes extraembrionarios como los embrionarios, es decir, pueden dar lugar a células propias de las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo), el linaje germinal y el saco vitelino. El cigoto es la célula totipotente por excelencia; ii) *células madre pluripotentes*, con capacidad para diferenciarse hacia células de las tres capas embrionarias, pero no hacia células de los tejidos extraembrionarios. Las células madre pluripotentes más estudiadas son las embrionarias aisladas de la masa celular interna del blastocisto; iii) *células madre germinales*, que pueden dar lugar a las gónadas y los gametos. Son células madre embrionarias pluripotentes que derivan de los esbozos gonadales del embrión situados en la cresta gonadal; iv) *células madre multipotentes*, capaces de generar solo células de su misma capa o linaje embrionario; y v) *células madre unipotentes o progenitoras*, con capacidad para diferenciarse a un solo tipo celular. Son típicamente las células madre adultas (CMA) presentes en tejidos y órganos del individuo adulto, capaces de regenerar los tejidos dañados o envejecidos.

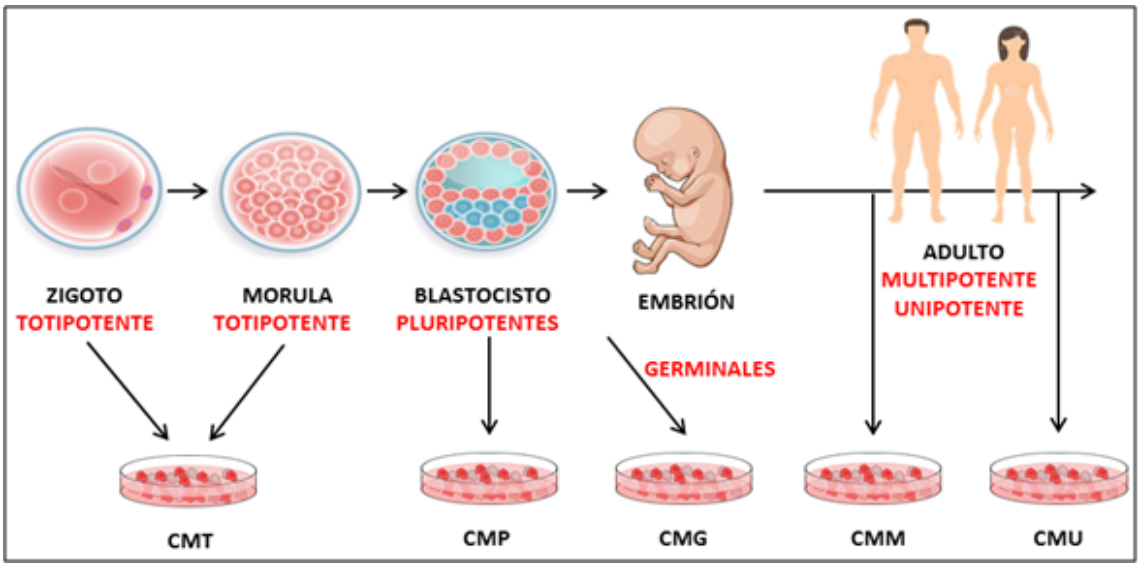


Fig 1. Tipos de células madre según su potencialidad. CMT, Células madre totipotentes; CMP, Células madre pluripotentes; CMG, Células madre germinales; CMM, Células madre multipotentes; CMU, Células madre unipotentes.

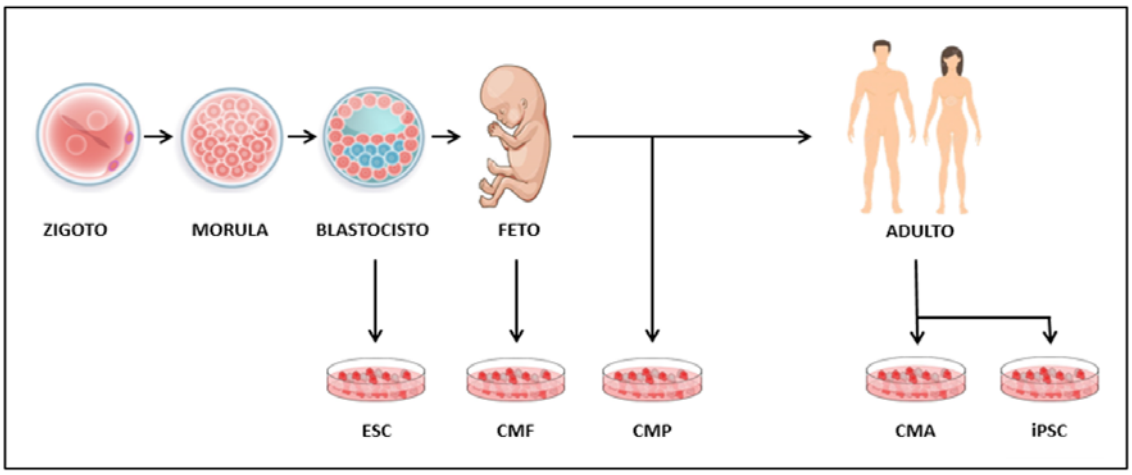


Fig 1. Desarrollo ontogénico humano y tipos de células madre aisladas: ESC, Células madre embrionarias; CMF, Células madre fetales; CMP, Células madre perinatales; CMA, Células madre adultas; iPSC, Células madre pluripotentes inducidas.

Por otro lado, y en relación al origen, las células madre pueden clasificarse en cinco categorías (6): i) células madre embrionarias, que proceden de la masa celular interna del blastocisto, son por tanto células pluripotentes. Se caracterizan por tener capacidad de división simétrica ilimitada, cariotipo normal y por mantenerse indiferenciadas y estables en las condiciones in vitro adecuadas. Sin embargo, su uso presenta ciertas limitaciones ya que tienden a formar teratomas tras su trasplante, pueden inducir rechazo tras su administración dada su identidad inmunológica propia, y existe un intenso debate ético en relación a su uso médico; ii) células madre fetales (CMF) que tienen su origen en el tejido fetal. A diferencia de las ESC, estas células presentan una capacidad de división limitada y

su uso genera menos controversia. Existen distintos tipos de CMF, sin embargo, su clasificación sigue sin estar totalmente definida y en muchas ocasiones se consideran CMA (6-8); iii) células madre perinatales (CMP) que son células multipotentes con propiedades similares a las ESC y CMA. Dado que proceden de tejido extraembrionario, el cual suele ser eliminado tras el nacimiento, el uso de este tipo celular no conlleva los problemas éticos asociados a las ESC. Las células madre perinatales se subdividen en distintas categorías en función de su procedencia, incluyendo células madre de fluido amniótico, de placenta y de cordón umbilical (9); iv) células madre pluripotentes inducidas (iPSC) que son células somáticas adultas reprogramadas genéticamente para expresar ciertos genes que conducen a un estado pluripotente (5, 7). Puesto que estas células pueden obtenerse de una fuente autóloga no producen rechazo en el paciente, sin embargo, su uso no está muy extendido por su capacidad para formar teratomas y la posible infección con los virus empleados en su generación; y v) células madre adultas, pequeñas poblaciones de células indiferenciadas que residen en tejidos adultos y presentan la capacidad de diferenciarse a tipos celulares maduros y perpetuarse a lo largo de la vida del individuo. Juegan un papel crucial no solo a la formación de órganos y tejidos, sino también en el mantenimiento, crecimiento y renovación de los mismos. Se ha conseguido su aislamiento a partir de varias fuentes como médula ósea, piel, corazón, músculo, cerebro y tejido adiposo, entre otras (6).

- **Células madre mesenquimales**

Las MSC, son células adultas multipotentes capaces de diferenciarse *in vitro* a distintos tipos celulares entre los que se encuentran los adipocitos, condrocitos, osteoblastos, hepatocitos, miocitos y también, a células de linaje neuronal, como neuronas o células de la glía. Están presentes tanto en el tejido adulto como en el embrionario, aunque, como hemos comentado previamente, el uso de estas últimas ha suscitado una profunda oposición ética.

Las MSC se han convertido en una de las principales herramientas para el desarrollo de protocolos terapéuticos en medicina regenerativa en general, dada su relativa facilidad de obtención a partir de numerosos tejidos. La Sociedad Internacional de Terapia Celular ha descrito los criterios mínimos necesarios para

definir y caracterizar este tipo celular *in vitro* (10): i) capacidad para adherirse al plástico, ii) morfología típica que se extiende desde fibroblástica a cuboidal (11), iii) potencialidad para diferenciarse en determinadas condiciones a hueso, cartílago, grasa, células de linaje neural, células pancreáticas, cardíacas y endoteliales, y la exhibición de un fenotipo característico con negatividad para la presencia de marcadores hematopoyéticos (CD34, CD45, glicoforina A, CD11a, CD14 o HLA-DR, y endoteliales como CD11b, CD31). Algunos marcadores propios de este tipo celular son el CD29, CD44, CD49, CD51, CD62, CD73, CD90, CD105, CD117, CD166, CD27 o Stro-1 (11). No obstante, el concepto de MSC ha sido muy controvertido hasta el punto de que recientemente se ha llegado a definir no como una población celular única sino, más bien, como una combinación heterogénea de tipos celulares con un comportamiento especial (12). Su aplicabilidad en patologías relacionadas con el SN ha sido demostrada ampliamente. De hecho, ya Lee y cols. (2003) (13) demostraron cómo estas MSC tenían la capacidad de migrar a zonas dañadas del sistema nervioso central (SNC) gracias a la liberación de señales, por parte del tejido inflamado o isquémico, en un proceso denominado *homing* o anidamiento, que permitía que las MSC se implantaran en el tejido dañado ejerciendo efectos funcionales y protectores. En cuanto a su localización, se han descrito en la mayoría de los tejidos adultos (14, 15), aunque las fuentes de MSC más empleadas en medicina regenerativa han sido la médula ósea, el cordón umbilical y el tejido adiposo. Han sido precisamente estas últimas, las derivadas de tejido adiposo, las que han demostrado un uso más ventajosos debido a su accesibilidad, facilidad de aislamiento y a la elevada tasa de células obtenidas (16).

- **Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo: diferenciación neural**

Como se ha comentado previamente, las MSC derivadas de tejido adiposo (también denominadas células madre/estromales adiposas o ASC) son las más ampliamente utilizadas en medicina regenerativa y poseen un elevado potencial de reparación y regeneración tisular. A este potencial hay que añadir el alto rendimiento en su proceso de obtención. Así, la mayoría de protocolos de aislamiento y purificación, que incluyen la digestión del tejido adiposo para separar la fracción estromal de la grasa y la sangre, permiten obtener entre un 2-10% de MSC, lo que representa aproximadamente 10.000 veces más células que las

obtenidas de una extracción de médula ósea (17). Además, la gran disponibilidad de tejido adiposo en el paciente convierte a las MSC en candidatas ideales para su uso en clínica (18). Estas células se caracterizan por poseer marcadores de células madre aceptados para su caracterización *in vitro* como son CD29+, CD44+, CD90+, CD13+, CD105+, CD31-, CD34, CD45-, CD105- y CD146- (19, 20).

Diferentes trabajos han demostrado la capacidad de diferenciación de las MSC, manipuladas o no *in vitro,* tras su implantación en el tejido a tratar, demostrándose la eficaz generación de adipocitos (21) osteoblastos (22), condrocitos (23), miocitos estriados (24) y lisos (25), cardiomiocitos (26), células hematopoyéticas (27), células endoteliales (28), células epiteliales (29), hepatocitos (30), células pancreáticas (31) y también células de linaje neural (32, 33). Por tanto, las MSC son también una potente herramienta para el tratamiento de lesiones nerviosas o neurodegenerativas (34, 35) existiendo numerosas evidencias de diferenciaciones neuronales funcionales de MSC tanto *in vivo* como *in vitro* (18, 36, 37). La metodología empleada incluye una gran cantidad de medios de diferenciación, muy diversos en composición, que provocan la modulación de diferentes marcadores neuronales y que han sido utilizados en diferentes experiencias (Tabla 1).

En este contexto, nuestros estudios han permitido obtener, a partir de MSC obtenidas de lipoaspirados, un grado de diferenciación neural notable, reversible y con aspectos de funcionalidad celular específica. Las MSC, aisladas siguiendo un protocolo clásico con digestión mediante colagenasa tipo I y el cultivo en medio estándar con suero bovino fetal (10%) y antibióticos durante 15 días (pase 4-5), se caracterizaron morfológicamente por su adherencia, tamaño medio-grande, núcleos redondeados y forma fibroblastoide. Además, los estudios fluorocitométricos demostraron un 99,2% de positividad para marcadores mesenquimales (CD73, CD105 y CD90) y solo un 2,16% de positividad para marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34 y CD133).

Tabla 1. Marcadores típicos de células neuronales y momento de aparición durante la diferenciación a linaje neuronal.

TIPO DE MARCAJE	MARCADOR	ASC CONTROL	ASC INDUCIDAS								REFERENCIA
			HORAS				DIAS				
			1	3	8	16	3	7	12	14	
NEURALES Y DE LA GLÍA	Nestina										(Cardozo, Gomez et al. 2011; Xu, Li et al. 2014)
NEURONAS EN DESARROLLO	PSA-NCAM										(Krampera, Marconi et al. 2007; Li, Han et al. 2013)
	B-Tubulina										(Cardozo, Gomez et al. 2011; Xu, Li et al. 2014)
NEURONAS MADURAS	NeuN										(Jang, Cho et al. 2010; Xu, Li et al. 2014)
	NSE										(Jang, Cho et al. 2010; Xu, Li et al. 2014)
	Trk-A										(Ashjian, Elbarbary et al. 2003; Jang, Cho et al. 2010)
	MAP2										(Jeon, Moon et al. 2006; Ahmadi, Razavi et al. 2012)
	NFH										(Jang, Cho et al. 2010)
	PMP-22										(Krampera, Marconi et al. 2007)
	Neuro-filamentos										(Jang, Cho et al. 2010)
	Tau										(Cardozo, Gomez et al. 2011)
	NF200										(Cardozo, Gomez et al. 2011)
	Sinap-tofisina										(Cardozo, Gomez et al. 2011)
	SNAP25										(Jang, Cho et al. 2010)
	SYN1										(Xu, Li et al. 2014)
CÉLULAS DE SCHWANN	GAP43										(Jang, Cho et al. 2010; Xu, Li et al. 2014)
OLIGO-DENDROCITOS	Gal-C										(Zuk, Zhu et al. 2002; Krampera, Marconi et al. 2007)
	CNPasa										(Jang, Cho et al. 2010)
ASTROCITOS	GFAP										(Cardozo, Gomez et al.2011) (Safford, Hicok et al. 2002)
	S-100										(Krampera, Marconi et al. 2007)

El proceso de diferenciación hacia linaje neuronal *in vitro* fue realizado mediante medios de inducción enriquecidos denominados Neu1, Neu2 y Neu3. Neu1 se caracterizó por contener factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor inhibidor de leucemia (LIF), siendo la exposición celular de 21 días. Neu2 incluyó el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y EGF, con una exposición de 15 días. Finalmente, Neu3 incluyó AMP cíclico, factor de crecimiento nervioso (NGF), insulina y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y se mantuvo durante 10 días en el cultivo. Los cambios morfológicos más evidentes fueron detectados con el uso del medio Neu1, incluyendo la aparición de prolongaciones citoplamáticas (a modo de dendritas) y la retracción del citoplasma hacia el núcleo más grande y redondeado (Figura 3). La diferenciación morfológica se acompañó de cambios en marcadores propios de células de linaje neuronal (Figura 4). La diferenciación se revirtió al sustituir los medios de inducción por medio estándar.

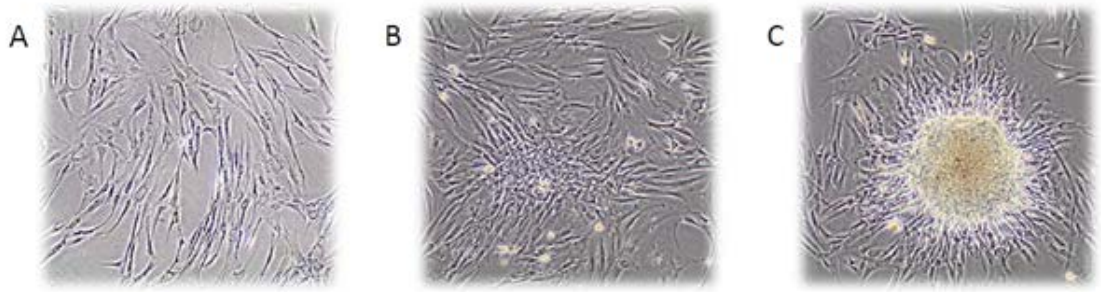


Fig 3. MSC sembradas en medio DMEM a los 7 días (A) y a los 12 días desde su aislamiento (B), con la aparición de núcleos de diferenciación (C).

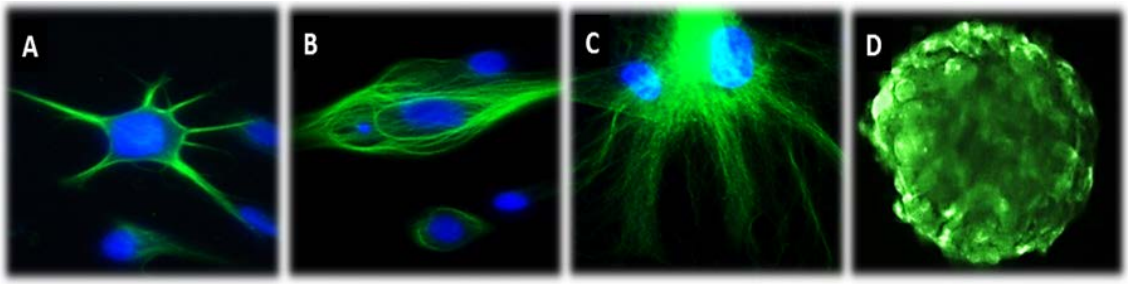


Fig 4. Diferenciación neural de MSC derivadas de tejido adiposo. Inmunofluorescencia para el marcador tirosina hidroxilasa de MSC expuestas al medio Neu1 (A), para la proteína TAU en MSC diferenciadas con el medio Neu2 (B), para tubulina-III en MSC tratadas con el medio Neu3 (C) y para vimentina en neuroesferos de MSC inducidos con el medio Neu1 (D).

- **Sistema nervioso: aplicación de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo**

A) Mecanismos terapeuticos de las msc en sistema nervioso

Las terapias que emplean células vivas, al contrario que los tratamientos basados en fármacos, tienen la ventaja de ser capaces de responder dinámicamente a un ambiente variable en el tiempo, en lugar de centrarse en una única vía o mecanismo de acción (38). Las MSC derivadas de tejido adiposo e implantadas en un tejido, incluyedo el sistema nervioso, son capaces de los siguientes mecanismos terapeúticos:

i) Secreción de factores neurotróficos: las ASC trasplantadas son capaces de secretar gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento, que promueven el crecimiento neural endógeno, la neurogénesis y la angiogénesis (39).

ii) Inducción de la neurogénesis y activación astroglial: las ASC inducen la proliferación de células progenitoras neurales y son críticas en la supervivencia de las células neurales recién formadas (40).

iii) Crecimiento axonal y mejora de las conexiones sinápticas: algunos estudios sugieren que los componentes de la matriz extracelular derivados de las MSC pueden mejorar la reparación del sistema nervioso dañado (41).

iv) Efecto anti-apoptótico: algunas investigaciones han mostrado un efecto protector de la apoptósis por parte de las ASC.

v) Efecto inmunomodulador: las MSC han demostrado tener efectos inmunosupresores sobre linfocitos B, disminuyendo su proliferación y diferenciación (42) al mismo tiempo que inhiben la proliferación de las células T citotoxicas y las *natural killer* (43).

vi) Efecto antiinflamatorio: el efecto antiinflamatorio que promueven las ASC ocurre principalmente por la sobreexpresión de factores antiinflamatorios como factor de crecimiento transformante (TGF)-β1 (44).

vii) Reduccion del estrés oxidativo: numerosos estudios han demostrado la capacidad de las ASC para reducir el estrés oxidativo e incluso secretar la proteina superóxido dismutasa (45, 46)

viii) Secreccion de exosomas: las ASC también son capaces de formar microvesículas que contienen gran variedad de moléculas biológicamente activas, como lípidos, proteinas, receptores de factores de crecimiento, microARN, etc, y verterlas al espacio extracelular (47, 48).

ix) Inducción de la angiogénesis: las ASC secretan citoquinas y factores de crecimiento que favorecen la proliferación de células madre y progenitores hematopoyéticos (49), además de estimular la diferenciación de células endoteliales (50).

x) Expresión génica: las ASC expresan un gran numero de genes relacionados con procesos neuronales como NCAM, NG2, S100 o p75, así como factores de transcripción. (51).

B) Aplicación de msc en lesión cerebral por traumatismo o infarto

La lesión cerebral, ya sea isquémica o por traumatismo, representa un auténtico problema de salud mundial que a menudo causa la muerte o una alta discapacidad al paciente, ocasionando fuertes cargas sociales y médicas (52). Solo el infarto cerebral causa 15 millones de muertes al año en el mundo (53) y sigue siendo una de las principales causas de discapacidad (54).

En general, las lesiones en el SNC y especialmente las del encéfalo, normalmente evolucionan en dos fases. La fase primaria corresponde al daño inmediato que sufre el tejido con una despolarización masiva de componentes celulares cerebrales y una reducción de los suministros de oxígeno y glucosa que conducen a la muerte de las células neuronales (55). La fase secundaria se produce pocas horas después de la lesión y puede durar varios días. Se caracteriza por un flujo intracelular de calcio, la generación de radicales libres con la consecuente peroxidación lipídica y una disfunción mitocondrial, lo que conduce a la apoptosis y necrosis de células neuronales. Las opciones para pacientes lesionados son limitadas y se centran en controlar la presión intracraneal y optimizar la perfusión cerebral (56, 57). Las principales modalidades de tratamiento son (i) la evacuación de coágulos extraaxiales, (ii) el drenaje del fluido cerebroespinal, (iii) la craniectomía descompresiva y (iv) las infusiones hiperosmolares. Hasta la fecha, el activador del plasminógeno tisular (tPA) es el único fármaco aprobado para tratar

esta lesión, pero su uso está limitado al estrecho intervalo de tiempo entre 3-5 horas tras su inicio.

En este contexto, la terapia celular se prevé como una gran oportunidad terapéutica para este tipo de lesiones y se basa e incluye la administración de MSC de distintas fuentes, que han demostrado mejorar significativamente las funciones neurológicas y la calidad de vida del paciente. En conjunto, parece que las mejoras en el lugar de la lesión son fruto no sólo del remplazo celular, sino de varios mecanismos que se trabajan al unísono y que incluyen las interacciones locales y sistémicas entre las MSC trasplantadas y las células adyacentes a la lesión, las interacciones con el sistema inmunitario, la regulación de la matriz celular en la zona lesionada (58) y la restauración temprana y preservación del flujo sanguíneo (59). Una ayuda relevante en esta terapia es el uso *scaffold* que suministra una matriz extracelular para mantener la viabilidad de las células implantadas. Su composición es muy variable, siendo los más utilizados los de fibrina (60), matrigel (61), colágeno (62) o quitosano y gelatina (63). El número de recientes ensayos preclínicos y clínicos (Tabla 2) con el objetivo de tratar el infarto y el traumatismo cerebral mediante MSC son indicativos de la cada vez mayor relevancia de las terapias celulares en este campo de la patología.

Tabla 2. Ensayos preclínicos y clínicos realizados para el tratamiento del infarto y el traumatismo cerebrales basados en el empleo de MSC.

ENSAYOS PRECLÍNICOS REALIZADOS CON MSC PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES CEREBRALES POR INFARTO						
REFERENCIA	AÑO	PAÍS	ESTUDIO	TIPO CELULAR	ESPECIE	RESULTADOS
(He, Moisan et al. 2017)	2017	Francia	Evaluation of Parametric Response Mapping to Assess Therapeutic Response to Human Mesenchymal Stem Cells after Experimental Stroke	BM-MSC	Ratas	El trasplante de MSC produce cambios en el edema celular, la plasticidad microvascular y la vasodilatación del tejido lesionado.
(Nijboer, Kooijman et al. 2018)	2018	Noruega	Intranasal stem cell treatm ent as a novel therapy for subarachnoid hemorrhage	BM-MSC	Ratas	La administración intranasal de MSC revierte los efectos de la hemorragia subaracnoidea, mejorando la regeneración de la lesión cerebral y la recuperación funcional
(Vibhuti, Khan et al. 2017)	2017	India	Intra-arterial transplantation of human bone marrow	BM-MSC	Ratas	Mejora significativa en los déficits conductuales pasados 14 días tras el

			mesenchymal stem cells hBMMSCs) improves behavioral deficits and alters gene expression in rodent stroke model			accidente al mejorar la coordinación motora y locomotora.
(Yamaguchi, Horie et al. 2017)	2017	Japon	Age of donor of human mesenchymal stem cells affects structural and functional recovery after cell therapy following ischaemic stroke.	ASC	Ratas	El trasplante de MSC de un paciente joven proporciona una mejor recuperación funcional a través de efectos antiinflamatorios, maduración vascular y neurogénesis, que las de un paciente de más edad.

ENSAYOS CLÍNICOS REALIZADOS CON MSC PARA EL TRATAMIENTO DEL INFARTO CEREBRAL

IDENTIFICADOR	PAIS	ESTUDIO	FASE	PACIENTES	AÑO	SEGURIDAD Y EFICIENCIA
NCT00875654	Francia	Trasplante autologo de MSC por via intravenosa en infarto cerebral pasadas menos de 6 semanas	2	31	2017	En marcha
NCT03356821	Paises Bajos	Trasplante intranasal de BM-MSC para tratar el infarto arterial perinatal	1/2	10	2017	En marcha
NCT01678534	España	Trasplante de MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo para tartar el infarto cerebral isquémico agudo.	2	20	2017	En marcha
NCT01468064	China	Trasplante de BM-MSC autólogas y progenitors endoteliales en infarto cerebral isquémico.	1/2	20	2017	En marcha
NCT01922908	USA	Trasplante de BM-MSC autólogas para tratar el infarto cerebral isquémico.	1/2	48	2017	En marcha
NCT03371329	USA	Trasplante de BM-MSC en pacientes con una hemorragia intracerebral reciente.	1	12	2017	En marcha
NCT02580019	China	Trasplante de HU-MSC en pacientes con infarto cerebral isquémico.	2	2	2017	En marcha
NCT02378974	Corea del Sur	Trasplante intravenoso de HU-MSC en pacientes con infarto cerebral isquémico.	1/2	18	2017	En marcha
NCT03176498	China	Trasplante intravenoso de HU-MSC en pacientes con infarto cerebral isquémico durante el periodo convaleciente.	1/2	40	2017	En marcha
NCT03186456	China	Trasplante de HU-MSC en pacientes con infarto cerebral agudo.	1	40	2017	En marcha
NCT02564328	China	Trasplante de BM-MSC autólogas para tratar el	1	40	2015	En marcha

		infarto cerebral crónico.				
NCT01714167	China	Trasplante de BM-MSC autólogas para tratar el infarto cerebral crónico.	1	30	2015	En marcha
NCT01461720	Malasia	Trasplante intravenoso de BM-MSC en pacientes con infarto en la arteria media cerebral.	2	50	2015	En marcha
NCT01716481	Corea del Sur	Trasplante intravenoso de MSC autólogas expandidas con serum autólogo en pacientes con infarto cerebral.	3	60	2017	En marcha
NCT01297413	USA	Trasplante de BM-MSC alogénicas para tratar el infarto cerebral isquémico.	1/2	38	2017	En marcha
NCT02849613	Francia	Trasplante intravenoso de ADSC alogénicas en pacientes con infarto cerebral	2/3	400	2016	En marcha
ENSAYOS CLÍNICOS REALIZADOS CON MSC PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES CEREBRALES POR TRAUMATISMO						
IDENTIFICADOR	PAIS	ESTUDIO	FASE	PACIENTES	AÑO	SEGURIDAD Y EFICIENCIA
(Liao, Harting et al. 2015)	USA	Estudio de los efectos autólogos de MSC derivadas de médula ósea inyectadas por vía intravenosa	1	19	2015	Seguridad: ninguna complicación Eficacia: mejora general comprobada por resonancia magnética y aumento en las capacidades funcionales y neurocognitivas
NCT01649700	Taiwan	Trasplante autólogo de ADSC en pacientes con secuelas tras un traumatismo cerebral severo	1/2	1	2015	Sin publicación asociada hasta el momento
NCT02742857	India	Trasplante intratecal de péptidos bioactivos, MSC y estimulación transcraneal con láser	1	20	2017	En marcha
NCT02525432	USA	Trasplante intravenoso de BM-MSC autólogas en lesión cerebral por traumatismo	2	55	2017	En marcha

BM-MSC: células madre mesenquimales de médula ósea. ASC: células madre mesenquimales de tejido adiposo.

C) Aplicación de msc en lesión de médula espinal

La lesión de la médula espinal ocurre con una incidencia mundial de 15-40 casos por millón de personas y año (64). Su gravedad es variable según la ubicación de la lesión y las deficiencias funcionales asociadas pueden ser de tipo

sensorial, motor o autonómico (65). Las lesiones medulares cursan en tres fases. La fase aguda comienza al producirse la lesión medular y provoca la toxicidad tisular como consecuencia de la ruptura de las membranas celulares neuronales y la liberación de los contenidos intracelulares y reservas de glutamato. El resultado es la necrosis masiva de células y un cambio de metabolismo hacia la glucólisis anaeróbica (66). En la segunda fase, que se activa a las 6-8 horas, continua la muerte celular por necrosis, apoptosis o daño excitotóxico, pudiendo prolongarse 24 horas tras la lesión en neuronas y varias semanas en oligodendrocitos (66-68). Por último, la tercera fase o fase crónica puede durar años y se caracteriza por la desmielinización continua de axones (69), inflamación local y apoptosis (70). La mayoría de pacientes permanecerán en esta fase, en mayor o menor medida, el resto de su vida. El enfoque terapéutico actual para tratar una lesión medular se divide en tres fases. En la primera fase, además de estabilizar las funciones vitales del paciente, el tratamiento persigue interrumpir en la medida de lo posible, la cascada de reacciones que conducen a una lesión secundaria. La segunda fase tiene como objetivo la neuroprotección de los tejidos dañados mediante la intervención quirúrgica, altas dosis de metilprednisolona y terapias sintomáticas (control infecciones urinarias, dolor, manejo intestinal, etc). Por último, se aplica rehabilitación para paliar las pérdidas funcionales del paciente.

Las estrategias neurorregenerativas que pueden lograrse con el trasplante de células madre en una lesión medular incluyen: i) diferenciación a oligodendrocitos para remielinizar axones desnudos; ii) diferenciación a neuronas para restaurar circuitos neuronales dañados; iii) señalización molecular para la correcta orientación en el crecimiento del axón; iv) aumento de la plasticidad sináptica con la formación de nuevas conexiones celulares; v) cotrasplante con biomateriales que permitan la reparación de la arquitectura neuronal dañada; vi) degradación de la cicatriz glial por enzimas como la condroitinasa y vii) modificación genética de las células trasplantadas para secretar factores de crecimiento. De los logros conseguidos a través de diferentes estudios preclínicos *in vivo* que implican la terapia celular con MSC en lesiones medulares (Tabla 3) se desprende que esta nueva vía de tratamiento será una herramienta esencial para la recuperación de los pacientes afectos de una lesión medular (71).

Estos resultados preclínicos ya han sido corroborados mediante ensayos clínicos con MSC en lesiones medulares, ensayos que se empezaron a desarrollar a partir del éxito obtenido en el tratamiento de patologías hematológicas (72, 73). Los datos recopilados por diversos estudios (Tabla 4) muestran que la implantación de MSC autólogas en la médula espinal no causa efectos secundarios adversos, cambios estructurales o neoformaciones tisulares de tipo tumoral. El número creciente de resultados experimentales *in vivo* de fase I y II positivos, sugieren que el trasplante de MSC conduce a mejoras funcionales y a regeneración tisular, lo que en última instancia mejoraría la calidad de vida de estos pacientes.

Tabla 3. Ensayos preclínicos basados en el uso de MSC para el tratamiento de lesiones medulares.

ENSAYOS PRECLÍNICOS REALIZADOS CON MSC PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES MEDULARES						
REFERENCIA	AÑO	PAÍS	ESTUDIO	TIPO CELULAR	ESPECIE	RESULTADOS
(Hwang, Shin et al. 2014)	2014	Corea del Sur	Survival of neural stem cell gr afts in the lesioned spinal cord is enhancedby a combination of treadmill locomotor training via insulin-like growth factor-1 signaling	NSC	Ratas	Modelos animales sometidos a un entrenamiento locomotor en después de una lesión y tras el tratamiento con células madre, muestran mayor supervivencia de células precursoras nerviosas
(Jeong, Kwon et al. 2012)	2012	Corea del Sur	Hepatocyte growth factor reduces astrocytic scar formation and promotes axo nalgrowth beyond glial scars after spinal cord injury.	BM-MSC	Ratas	Los animales tratados con MSC que sobreexpresan HGF aumentan el crecimiento axonal y mejoran la recuperación de la función de la pata delantera.
(Zhang, Zhang et al. 2012)	2012	China	Neurotrophin-3 gene modified mesenchymal stem cells promote remyelination and functional recovery in the demyelinated spinal cord of rats	BM-MSC	Ratas	Los implantes NT-3-MSC promueven la remielinización celular endógena y participas directamente en la mielinización.
(Oh, Park et al. 2012)	2012	Corea del Sur	Transplantation of an adipose stem cell cluster in a spinal cord injury	ADSC	Ratas	El trasplante de neuroesferas de ADSC en la médula espinal lesionada aumenta las formaciones vasculares y el crecimiento axonal.
(Park, Lee et al. 2012)	2012	Corea del Sur	Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of Matrigel and neural-induced adipose-derived	ADSC	Perros	La combinación de Matrigel y ADSC inducidas neuronalmente induce respuesta antiinflamatoria,

			mesenchymal Stem cells			antiastrogliosis, así como mayor extensión y regeneración neuronal.
(Zhou, Chen et al. 2013)	2013	China	Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury	ADSC	Ratas	El trasplante de ADSC sería más apropiado que el de BM-MSC como terapia para el tratamiento de lesiones medulares.
(Zaminy, Shokrgozar et al. 2013)	2013	Irán	Transplantation of schwann cells differentiated from adipose stem cells improves functional recovery in rat spinal cord injury	ADSC	Ratas	Las células de Schwann derivadas de tejido adiposo pueden cambiar el entorno de la médula espinal dañada, favorecer la regeneración de los axones y mejorar la recuperación funcional.

Tabla 4. Ensayos clínicos basados en el uso de MSC para el tratamiento de lesiones medulares.

ENSAYOS CLÍNICOS REALIZADOS CON MSC PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES MEDULARES						
IDENTIFICADOR	PAIS	ESTUDIO	FASE	PACIENTES	AÑO	SEGURIDAD Y EFICIENCIA
NCT02165904 (Vaquero, Zurita et al. 2017)	España	Transferencia subaracnoidea de MSC autólogas derivadas de médula ósea en lesiones de médula espinal	2	10	2017	Seguridad: Ningún efecto secundario pasado un año Eficacia: mejoras funcionales en todos los pacientes
NCT02481440	China	Evaluación de la seguridad y eficiencia del trasplante de MSC alogénicas derivadas de cordón umbilical	1/2	44	2017	En marcha
NCT01676441	Corea del Sur	Evaluación de la seguridad y eficiencia del trasplante de MSC autólogas en lesiones de médula espinal crónica	2/3	32	2016	En marcha
NCT02574585	Brasil	Transferencia de MSC autólogas derivadas de médula ósea en lesiones de médula espinal lumbar	2	40	2017	En marcha
NCT02574572	Brasil	Transferencia de MSC autólogas derivadas de médula ósea en lesiones de médula espinal cervical	1	10	2017	En marcha
NCT02152657	Brasil	Transferencia de MSC autólogas por punción percutánea en lesiones de médula espinal	5	1	2017	Sin publicación asociada por el momento
NCT02482194	Pakistán	Transferencia intratecal de MSC autólogas derivadas de médula ósea en lesiones de médula espinal	1	9	2016	Seguridad: Ningún efecto secundario observado tras dos años
NCT02688049	China	Tratamiento combinado de MSC y NeuroRegen scaffold	1/2	30	2017	En marcha

NCT02570932	España	Transferencia intratecal de MSC autólogas derivadas de médula ósea en lesiones de médula espinal	2	10	2017	En marcha
NCT01769872	Corea del Sur	Seguridad y eficiencia del trasplante de MSC derivadas de tejido adiposo en lesiones de médula ósea	1/2	15	2016	Sin publicación asociada por el momento
NCT03003364	España	Transferencia intratecal de MSC autólogas derivadas de la gelatina de Wharton en lesiones de médula espinal	1/2	10	2017	Sin publicación asociada por el momento
NCT02352077 (Zhao, Tang et al. 2017)	China	Eficiencia del trasplante de MSC derivadas de médula ósea junto con NeuroRegen scaffold en lesiones de médula ósea	1	30	2016	Seguridad: Ningún efecto secundario observado en un año Eficacia: pequeñas mejoras sensoriales en todos los pacientes
NCT02981576	Jordania	Comparación de los trasplantes de MSC derivadas de tejido adiposo y médula ósea	1/2	14	2017	En marcha
NCT02917291	España	Eficiencia del trasplante alogénico de MSC derivadas de tejido adiposo combinadas con H2O2 y células HC016 en lesiones de médula ósea	1/2	46	2017	En marcha
NCT03308565	Estados Unidos	Eficiencia del trasplante de MSC derivadas de tejido adiposo en el líquido cefalorraquídeo en lesiones de médula ósea	1	10	2017	En marcha
NCT01909154	España	Transferencia de MSC autólogas derivadas de médula ósea en lesiones de médula espinal	1	12	2017	Seguridad: Ningún efecto secundario observado Eficacia: pequeñas mejoras sensoriales en todos los pacientes y descenso de los espasmos
NCT01624779	Corea del Sur	Transferencia intratecal de MSC autólogas derivadas de tejido adiposo en lesiones de médula espinal crónica	1	15	2015	Sin publicación asociada por el momento
NCT01393977	China	Diferencias entre la rehabilitación y el trasplante en pacientes con lesión medular en China	2	60	2017	Sin publicación asociada por el momento
NCT02881489	Polonia	Trasplante de MSC autólogas derivadas de medula ósea en lesiones de médula espinal crónica	1	30	2017	En marcha

Conclusión

Dada la creciente incidencia de las enfermedades del SN en general, y de las lesiones causadas por traumatismo o infarto cerebral y lesiones medulares en particular, y la ineficacia de los tratamientos actuales para estas patologías, existe un notable interés científico y social en torno a la aplicabilidad clínica de las células madre como una nueva estrategia terapéutica que facilite la recuperación de estos pacientes y mejore su pronóstico y calidad de vida. En este contexto, los resultados obtenidos tanto en experiencias *in vitro* como *in vivo* con las conocidas como MSC derivadas de tejido adiposo parece ser lo suficientemente relevantes y exitosos para prever que esta terapia podrá ser en un futuro no muy lejano aplicada a los pacientes. Las MSC presentan no sólo una demostrada capacidad de diferenciación hacia distintos linajes celulares, sino una notable accesibilidad, facilidad de obtención de los propios pacientes y alta productividad celular que las posicionan de forma muy ventajosa en relación a otros tipos de células madre, además de no suscitar problemas éticos por su utilización. No obstante, su aplicación real en la práctica clínica requerirá de más amplios estudios que desentrañen los eventos moleculares que subyacen a la diferenciación de las MSC hacia tipos celulares neuronales, con el fin de conseguir terapias seguras que supongan un importante cambio de paradigma en el tratamiento de las enfermedades del SN.

Bibliografía

1. Ahmadi N, Razavi S, Kazemi M, and Oryan S. (2012). Stability of neural differentiation in human adipose derived stem cells by two induction protocols. Tissue Cell. 44(2), 87-94.

2. Qu X, Liu T, Song K, Li X, and Ge D. (2013). Differentiation of reprogrammed human adipose mesenchymal stem cells toward neural cells with defined transcription factors. Biochem Biophys Res Commun. 439(4), 552-8.

3. Tam RY, Fuehrmann T, Mitrousis N, and Shoichet MS. (2014). Regenerative therapies for central nervous system diseases: a biomaterials approach. Neuropsychopharmacology.39(1):169-88.

4. Takahashi J. (2018). Stem cells and regenerative medicine for neural repair. Curr Opin Biotechnol. 52:102-8.

5. Kalra K, and Tomar PC. (2014). Stem cell: basics, classification and applications AJPCT. 4(6), 919-30.

6. Ilic D and Polak JM. (2011). Stem cells in regenerative medicine: introduction. Br Med Bull. 98(117-26.

7. Sudulaguntla A, Gurung S, Nanjwade BK, and Tamang K. (2016). A review: stem cells and classification of stem cells based on their origin. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 5(11):534-56.

8. Hima Bindu A, and Srilatha B. (2011). Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. J Stem Cell Res Ther. 1:115.

9. Si JW, Wang XD, and Shen SG. (2015). Perinatal stem cells: A promising cell resource for tissue engineering of craniofacial bone. World J Stem Cells. 7(1), 149-59.

10. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, and Keating A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 7(5), 393-5.

11. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, and Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 284(5411), 143-7.

12. Han ZC, Du WJ, Han ZB, and Liang L. (2017). New insights into the heterogeneity and functional diversity of human mesenchymal stem cells. Biomed Mater Eng. 28(s1), S29-S45.

13. Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, and Jung JS. (2003). Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. Exp Neurol. 183(2), 355-66.

14. Castro-Manrreza ME, Mayani H, Monroy-Garcia A, Flores-Figueroa E, Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet V, Santiago-Osorio E, and Montesinos JJ. (2014). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. Stem Cells Dev. 23(11), 1217-32.

15. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, and Nardi NB. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci. 119(Pt 11), 2204-13.

16. Gupta MK and Ajay AK. (2015). Fat on sale: role of adipose-derived stem cells as anti-fibrosis agent in regenerative medicine. Stem Cell Res Ther. 6(233.

17. Pikula M, Marek-Trzonkowska N, Wardowska A, Renkielska A, and Trzonkowski P. (2013). Adipose tissue-derived stem cells in clinical applications. Expert Opin Biol Ther. 13(10), 1357-70.

18. Zavan B, Vindigni V, Gardin C, D'Avella D, Della Puppa A, Abatangelo G, and Cortivo R. (2010). Neural potential of adipose stem cells. Discov Med. 10(50), 37-43.

19. Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, and van Milligen FJ. (2007). Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. Stem Cells Dev. 16(1), 91-104.

20. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, and Gonda K. (2006). Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. J Cell Physiol. 208(1), 64-76.

21. Mauney JR, Nguyen T, Gillen K, Kirker-Head C, Gimble JM, and Kaplan DL. (2007). Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds. Biomaterials. 28(35), 5280-90.

22. Li X, Yao J, Wu L, Jing W, Tang W, Lin Y, Tian W, and Liu L. (2010). Osteogenic induction of adipose-derived stromal cells: not a requirement for bone formation in vivo. Artif Organs. 34(1), 46-54.

23. Zheng B, Cao B, Li G, and Huard J. (2006). Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. Tissue Eng. 12(7), 1891-901.

24. Kang Y, Park C, Kim D, Seong CM, Kwon K, and Choi C. (2010). Unsorted human adipose tissue-derived stem cells promote angiogenesis and myogenesis in murine ischemic hindlimb model. Microvasc Res. 80(3), 310-6.

25. Jack GS, Zhang R, Lee M, Xu Y, Wu BM, and Rodriguez LV. (2009). Urinary bladder smooth muscle engineered from adipose stem cells and a three dimensional synthetic composite. Biomaterials. 30(19), 3259-70.

26. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, and Mori H. (2006). Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. Nat Med. 12(4), 459-65.

27. Cousin B, Andre M, Arnaud E, Penicaud L, and Casteilla L. (2003). Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun. 301(4), 1016-22.

28. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, and Casteilla L. (2004). Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. Circulation. 109(5), 656-63.

29. Yang Z, Li K, Yan X, Dong F, and Zhao C. (2010). Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 248(10), 1415-22.

30. Sgodda M, Aurich H, Kleist S, Aurich I, Konig S, Dollinger MM, Fleig WE, and Christ B. (2007). Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. Exp Cell Res. 313(13), 2875-86.

31. Lin G, Wang G, Liu G, Yang LJ, Chang LJ, Lue TF, and Lin CS. (2009). Treatment of type 1 diabetes with adipose tissue-derived stem cells expressing pancreatic duodenal homeobox 1. Stem Cells Dev. 18(10), 1399-406.

32. di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, and Kalbermatten DF. (2010). Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 63(9), 1544-52.

33. Nakada A, Fukuda S, Ichihara S, Sato T, Itoi S, Inada Y, Endo K, and Nakamura T. (2009). Regeneration of central nervous tissue using a collagen scaffold and adipose-derived stromal cells. Cells Tissues Organs. 190(6), 326-35.

34. Khalifian S, Sarhane KA, Tammia M, Ibrahim Z, Mao HQ, Cooney DS, Shores JT, Lee WP, and Brandacher G. (2015). Stem cell-based approaches to improve nerve regeneration: potential implications for reconstructive transplantation? Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 63(1), 15-30.

35. Zack-Williams SD, Butler PE, and Kalaskar DM. (2015). Current progress in use of adipose derived stem cells in peripheral nerve regeneration. World J Stem Cells. 7(1), 51-64.

36. Erba P, Terenghi G, and Kingham PJ. (2010). Neural differentiation and therapeutic potential of adipose tissue derived stem cells. Curr Stem Cell Res Ther. 5(2), 153-60.

37. Franco Lambert AP, Fraga Zandonai A, Bonatto D, Cantarelli Machado D, and Pegas Henriques JA. (2009). Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? Differentiation. 77(3), 221-8.

38. Kalladka D and Muir KW. (2014). Brain repair: cell therapy in stroke. Stem Cells Cloning. 7(31-44.

39. Nagai A, Kim WK, Lee HJ, Jeong HS, Kim KS, Hong SH, Park IH, and Kim SU. (2007). Multilineage potential of stable human mesenchymal stem cell line derived from fetal marrow. PLoS One. 2(12), e1272.

40. Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Lee HS, Kim HS, Lee YD, and Suh-Kim H. (2008). Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. Exp Mol Med. 40(4), 387-97.

41. Maltman DJ, Hardy SA, and Przyborski SA. (2011). Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. Neurochem Int. 59(3), 347-56.

42. Budoni M, Fierabracci A, Luciano R, Petrini S, Di Ciommo V, and Muraca M. (2013). The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles. Cell Transplant. 22(2), 369-79.

43. Wang SP, Wang ZH, Peng DY, Li SM, Wang H, and Wang XH. (2012). Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: reduced apoptosis and enhanced neuroprotection. Mol Med Rep. 6(4), 848-54.

44. Hawryluk GW, Mothe A, Wang J, Wang S, Tator C, and Fehlings MG. (2012). An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. Stem Cells Dev. 21(12), 2222-38.

45. Kemp K, Hares K, Mallam E, Heesom KJ, Scolding N, and Wilkins A. (2010). Mesenchymal stem cell-secreted superoxide dismutase promotes cerebellar neuronal survival. J Neurochem. 114(6), 1569-80.

46. Chen YT, Sun CK, Lin YC, Chang LT, Chen YL, Tsai TH, Chung SY, Chua S, Kao YH, Yen CH, Shao PL, Chang KC, Leu S, and Yip HK. (2011). Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. J Transl Med. 9(51.

47. Tomasoni S, Longaretti L, Rota C, Morigi M, Conti S, Gotti E, Capelli C, Introna M, Remuzzi G, and Benigni A. (2013). Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 22(5), 772-80.

48. Kim HS, Choi DY, Yun SJ, Choi SM, Kang JW, Jung JW, Hwang D, Kim KP, and Kim DW. (2012). Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. J Proteome Res. 11(2), 839-49.

49. Caplan AI and Dennis JE. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J Cell Biochem. 98(5), 1076-84.

50. Miranville A, Heeschen C, Sengenes C, Curat CA, Busse R, and Bouloumie A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. Circulation. 110(3), 349-55.

51. Arboleda D, Forostyak S, Jendelova P, Marekova D, Amemori T, Pivonkova H, Masinova K, and Sykova E. (2011). Transplantation of predifferentiated adipose-derived stromal cells for the treatment of spinal cord injury. Cell Mol Neurobiol. 31(7), 1113-22.

52. Venkat P, Shen Y, Chopp M, and Chen J. (2017). Cell-based and pharmacological neurorestorative therapies for ischemic stroke. Neuropharmacology.

53. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, and Davis SM. (2008). Stroke. Lancet. 371(9624), 1612-23.

54. Kissela B, Broderick J, Woo D, Kothari R, Miller R, Khoury J, Brott T, Pancioli A, Jauch E, Gebel J, Shukla R, Alwell K, and Tomsick T. (2001). Greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study: volume of first-ever ischemic stroke among blacks in a population-based study. Stroke. 32(6), 1285-90.

55. Sims NR and Muyderman H. (2010). Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. Biochim Biophys Acta. 1802(1), 80-91.

56. Alali AS, Fowler RA, Mainprize TG, Scales DC, Kiss A, de Mestral C, Ray JG, and Nathens AB. (2013). Intracranial pressure monitoring in severe traumatic brain injury: results from the American College of Surgeons Trauma Quality Improvement Program. J Neurotrauma. 30(20), 1737-46.

57. Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, McConnell Hammond FF, Harris OA, Hartl R, Manley GT, Nemecek A, Newell DW, Rosenthal G, Schouten J, Shutter L, Timmons SD, Ullman JS, Videtta W, Wilberger JE, and Wright DW. (2007). Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. XI. Anesthetics, analgesics, and sedatives. J Neurotrauma. 24 Suppl 1(S71-6.

58. Tajiri N, Kaneko Y, Shinozuka K, Ishikawa H, Yankee E, McGrogan M, Case C, and Borlongan CV. (2013). Stem cell recruitment of newly formed host cells via a successful seduction? Filling the gap between neurogenic niche and injured brain site. PLoS One. 8(9), e74857.

59. Li L, Jiang Q, Qu CS, Ding GL, Li QJ, Wang SY, Lee JH, Lu M, Mahmood A, and Chopp M. (2011). Transplantation of marrow stromal cells restores cerebral blood flow and reduces cerebral atrophy in rats with traumatic brain injury: in vivo MRI study. J Neurotrauma. 28(4), 535-45.

60. Lam PK, Lo AW, Wang KK, Lau HC, Leung KK, Li KT, Lai PB, and Poon WS. (2013). Transplantation of mesenchymal stem cells to the brain by topical application in an experimental traumatic brain injury model. J Clin Neurosci. 20(2), 306-9.

61. Yan ZJ, Zhang P, Hu YQ, Zhang HT, Hong SQ, Zhou HL, Zhang MY, and Xu RX. (2013). Neural stem-like cells derived from human amnion tissue are effective in treating traumatic brain injury in rat. Neurochem Res. 38(5), 1022-33.

62. Guan J, Zhu Z, Zhao RC, Xiao Z, Wu C, Han Q, Chen L, Tong W, Zhang J, Gao J, Feng M, Bao X, Dai J, and Wang R. (2013). Transplantation of human mesenchymal stem cells loaded on collagen scaffolds for the treatment of traumatic brain injury in rats. Biomaterials. 34(24), 5937-46.

63. Gao S, Zhao P, Lin C, Sun Y, Wang Y, Zhou Z, Yang D, Wang X, Xu H, Zhou F, Cao L, Zhou W, Ning K, Chen X, and Xu J. (2014). Differentiation of human adipose-derived stem cells into neuron-like cells which are compatible with photocurable three-dimensional scaffolds. Tissue Eng Part A. 20(7-8), 1271-84.

64. Sahni V and Kessler JA. (2010). Stem cell therapies for spinal cord injury. Nat Rev Neurol. 6(7), 363-72.

65. Schwab ME. (2002). Repairing the injured spinal cord. Science. 295(5557), 1029-31.

66. Emery E, Aldana P, Bunge MB, Puckett W, Srinivasan A, Keane RW, Bethea J, and Levi AD. (1998). Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. J Neurosurg. 89(6), 911-20.

67. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, and Choi DW. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. J Neurosci. 17(14), 5395-406.

68. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, and Beattie MS. (1997). Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. Nat Med. 3(1), 73-6.

69. Totoiu MO and Keirstead HS. (2005). Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. J Comp Neurol. 486(4), 373-83.

70. Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, Pasquale-Styles M, Dietrich WD, and Weaver LC. (2006). The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. Brain. 129(Pt 12), 3249-69.

71. Kwon BK, Soril LJ, Bacon M, Beattie MS, Blesch A, Bresnahan JC, Bunge MB, Dunlop SA, Fehlings MG, Ferguson AR, Hill CE, Karimi-Abdolrezaee S, Lu P, McDonald JW, Muller HW, Oudega M, Rosenzweig ES, Reier PJ, Silver J, Sykova E, Xu XM, Guest JD, and Tetzlaff W. (2013). Demonstrating efficacy in preclinical studies of cellular therapies for spinal cord injury - how much is enough? Exp Neurol. 248(30-44.

72. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, and Zeiher AM. (2006). Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. Eur Heart J. 27(23), 2775-83.

73. Bang OY, Lee JS, Lee PH, and Lee G. (2005). Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. Ann Neurol. 57(6), 874-82.

Capítulo 8

Mecanismos de resistencia en glioblastoma multiforme

Perazzoli G, Cabeza L, Jiménez-Luna C, Ortiz R, Prados J, Melguizo C

Resumen

El Glioblastoma multiforme es el tumor astrocítico más común en la población adulta, con una supervivencia global inferior al año y una progresión rápida de la enfermedad. El tratamiento inicial se basa en la cirugía, tras la cual se somete al paciente a radioterapia y quimioterapia adyuvante con la temozolamida como fármaco de elección. A pesar de que el uso de este quimioterápico supuso un avance en el tratamiento del Glioblastoma multiforme, existen pacientes en los que no mejora el pronóstico. Esto es debido a la presencia de mecanismos de resistencia frente al fármaco. Los mecanismos de resistencia más estudiados en este tipo tumoral son la proteína metil-guanina-O6-DNA metiltransferasa (MGMT) y el sistema de reparación de errores MMR. Existen numerosos estudios que apuntan hacia una relación entre estos dos mecanismos de reparación del DNA celular y la resistencia a la temozolamida. Además de estos, existen otros mecanismos de resistencia como es el sistema de reparación por escisión de bases BER, la existencia de subpoblaciones celulares con fenotipo de células madre tumorales o la propia resistencia adquirida de las células tumorales tras el tratamiento, que hacen que existan pacientes que no respondan al tratamiento con temozolamida. El objetivo de este trabajo ha sido analizar y agrupar los últimos conocimientos y avances en el estudio de resistencia a la temozolamida.

Introducción

Los tumores gliales son los tumores más frecuentes del sistema nervioso central. De entre ellos el Glioblastoma Multiforme (GMB), considerado un astrocitoma de grado IV por la Organización Mundial de la Salud, es el más agresivo y con mayor prevalencia, con una supervivencia de entre 12 y 15 meses tras el diagnóstico (1-2). Este tipo tumoral presenta una incidencia de 6,4 por cada 100.000 personas al año y una mortalidad de 4,4 por cada 100,000 personas al año (datos obtenidos de los años 2011-2015) (3). El GMB se caracteriza por un crecimiento rápido, una gran invasividad y angiogénesis, y una evolución pre quirúrgica y posquirúrgica rápida con una alta tasa de mortalidad (4-5).

La selección de fármacos antitumorales sistémicos para el tratamiento del GMB es compleja puesto que deben ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica para ser efectivos. El tratamiento del GMB se inicia con la resección quirúrgica en aquellos casos en los que es posible por la localización del tumor y su tamaño (6). Sin embargo, hay ocasiones en las que no se puede llevar a cabo la resección completa del tumor mediante debido a la alta actividad proliferativa con infiltración en tejidos circundantes ya que es un tumor que presenta una alta vascularización (7). La cirugía es clave en el tratamiento de este tipo de tumores ya que, en primer lugar, reduce la masa tumoral lo que conlleva a una reducción de la presión intracraneal, en segundo lugar, proporciona una muestra para diagnóstico histológico, en tercer lugar, es el método más rápido y efectivo para controlar la sintomatología, y por último permite una mayor eficacia de la quimiorradioterapia. Tras la cirugía el paciente es sometido a radioterapia y quimioterapia con temozolamida (TMZ) como quimioterápico adyuvante (8). La TMZ es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Figura 1), aunque tiene una corta vida media, por lo que requiere altas dosis sistémicas para alcanzar los niveles terapéuticos (9). La preferencia de la TMZ por tejido tumoral puede ser explicado debido a la diferencia de pH en entorno tumoral. La TMZ es muy estable al pH ácido del estómago, aunque una vez en contacto con el pH básico de la sangre y de los tejidos, espontáneamente, se hidroliza dando lugar al metabolito activo, el monometiltriazeboimidazolcarboxamida (MTIC) que se rompe para formar el ión reactivo Metildiazonio (10). Este actúa como un agente alquilante produciendo

efectos citotóxicos a través de la metilación del ADN de la célula, lo que conduce a una parada del ciclo celular en fase G2 / M provocando la muerte celular (11).

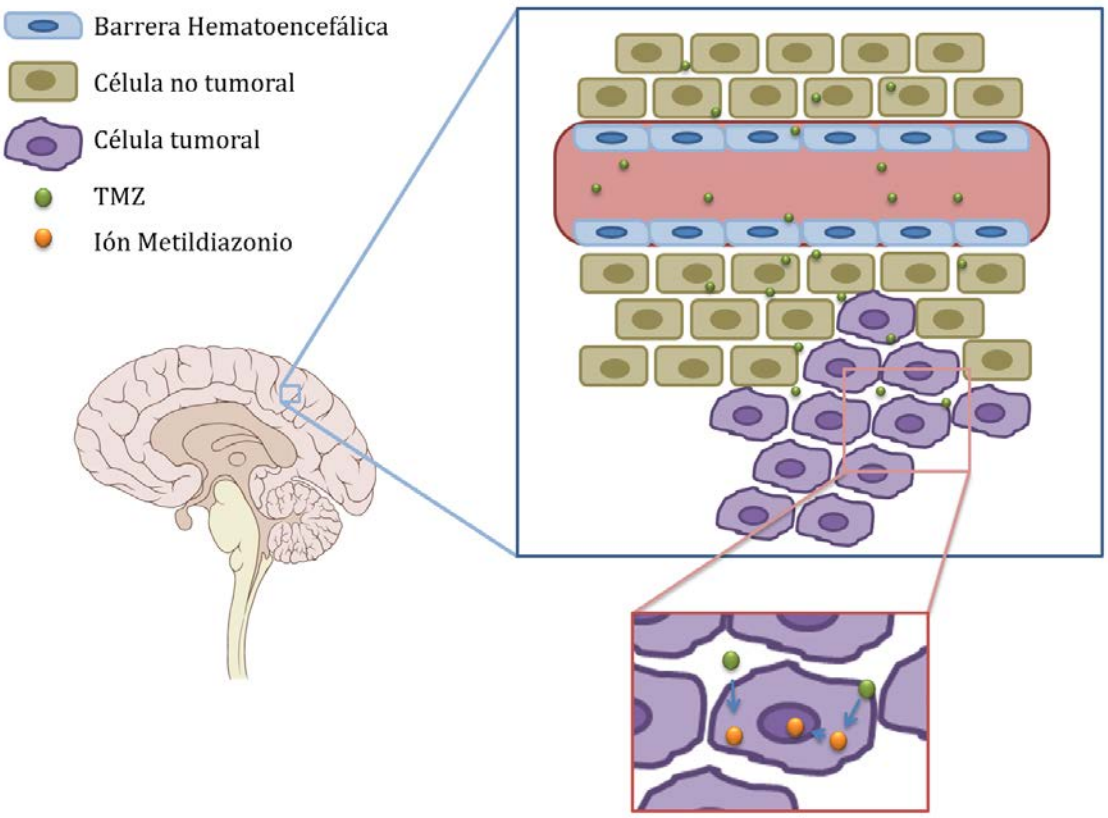


Fig 1. Mecanismo de acción de la temozolamida. La TMZ a través del torrente sanguíneo, llega al cerebro y atraviesa la barrera hematoencefálica. Una vez en el tumor y debido al pH ácido del mismo, da lugar a su ión reactivo, el ión Metildiazonio el cual ejerce el efecto alquilante en la célula tumoral.

Mecanismos de resistencia

A pesar de lo prometedor del tratamiento, la radioterapia y quimioterapia utilizada tiene algunas limitaciones derivadas del tamaño del tumor siendo los tumores más pequeños, con un volumen inferior a 3,88 ml, los que mejor responden. A esto debemos sumarle un conjunto de efectos secundarios indeseables asociados, como son la toxicidad cutánea, las úlceras gastrointestinales, la pérdida de cabello, la neumonitis y las enfermedades cardíacas (12). Además, existen pacientes en los que se dan recidivas o progresiones del tumor, asociadas a una resistencia al fármaco. Rutas de señalización no reguladas, vías de reparación del ADN, persistencia de

subpoblaciones de células madre tumorales (CSC) y mecanismos de autodefensa, son algunas de las causas de la resistencia a la TMZ (11). La heterogeneidad inter e intratumoral, junto con la barrera hematoencefálica y la resistencia al tratamiento, hacen del GMB uno de los tumores más letales. Los dos principales mecanismos de resistencia frente a la TMZ son la proteína MGMT y la deficiencia en el sistema de reparación de errores del DNA (MMR) (13) aunque también existen otros mecanismos de resistencia como son la reparación por escisión de bases (BER), la existencia de subpoblaciones celulares con fenotipo de células madre tumorales (GSC) y la resistencia adquirida (Figura 2). A continuación, pasaremos a explicar cada mecanismo en detalle.

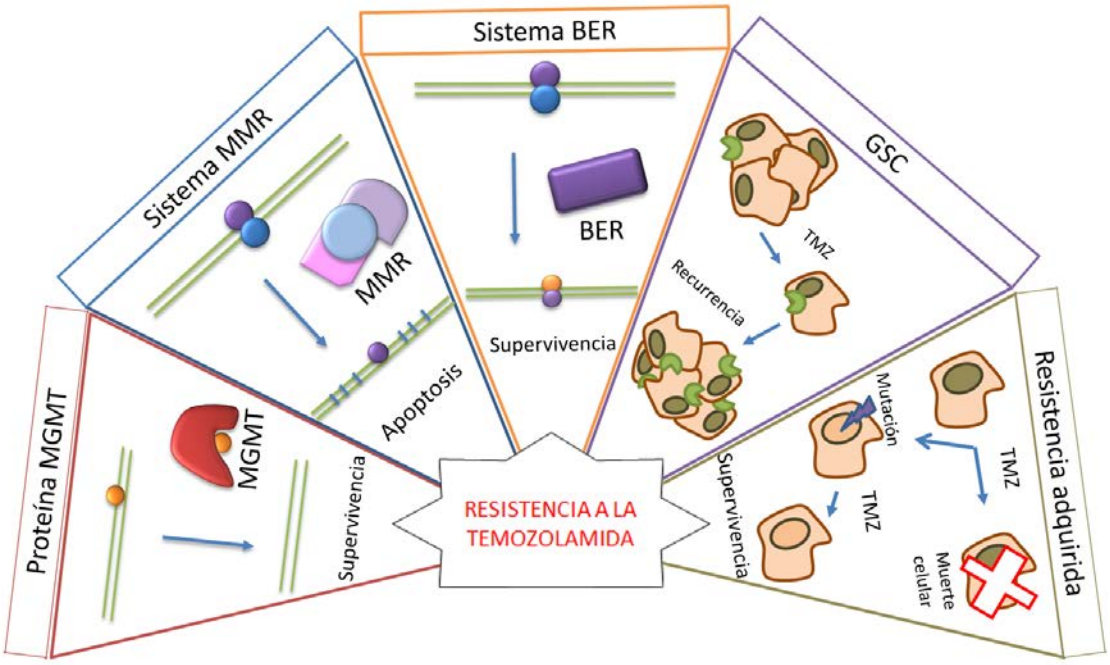


Fig 2. Esquema de los mecanismos de resistencia a la temozolamida presentes en Glioblastoma. La presencia de la proteína MGMT, el sistema de reparación de errores MMR, el sistema de reparación de escisión de bases BER, las células madre tumorales de Glioblastoma y el desarrollo de resistencia adquirida favorecen la resistencia frente al fármaco.

- **Proteína de reparación MGMT**

MGMT (metil-guanina-O6-DNA metiltransferasa) es una proteína reparadora del DNA que protege al genoma de la célula de los efectos mutagénicos de los agentes alquilantes como la TMZ (14). En el cromosoma 10 se encuentra el gen que codifica para la proteína MGMT. Este gen está epigenéticamente regulado

mediante la metilación de las 25 islas CpG que componen su promotor (15). Cuando las regiones CpG del promotor de MGMT se encuentran sin metilar la polimerasa se une dando lugar a la expresión de la proteína. Sin embargo, cuando las regiones CpG del promotor se encuentran metiladas la polimerasa no encuentra sitios de unión y por tanto no dará lugar a la transcripción y a la síntesis de la proteína, produciéndose un silenciamiento de la misma (16).

La función de la proteína MGMT es la reparación del DNA, elimina grupos alquilo provocados por la acción de agentes alquilantes como la TMZ, que introduce grupos metilo a nivel del átomo O6 de la guanina. Esta transferencia se realiza a un sitio activo interno representado por un residuo de cisteína en la secuencia de aminoácidos de la proteína, lo que inactiva de forma irreversible la molécula de MGMT. Este hecho, hace que a esta proteína también se la denomina enzima suicida ya que no puede ser reutilizada, debiendo ser resintetizado *de novo* por las células. Por esta razón, se requiere un reemplazo continuo de MGMT para garantizar un sistema de reparación de ADN efectivo (17-19).

Dado que la proteína MGMT constituye un mecanismo de reparación que contrarresta el daño causado por la TMZ en el ADN, el nivel de expresión de MGMT está directamente relacionado con la resistencia a la quimioterapia (20). En consecuencia, las células tumorales que expresan una mayor actividad de MGMT son más resistentes a los efectos citotóxicos de la TMZ que las que carecen de actividad de MGMT.

Existen numerosos estudios in vitro, (13, 21-22), que han observado una correlación entre la expresión de MGMT y la respuesta a la quimioterapia con TMZ, sugiriendo que el estudio de los niveles de MGMT se podría usar como factor predictivo de la respuesta al tratamiento. Esto evitaría una administración sistemática del tratamiento con quimioterapia haciendo que dependiendo del estado de metilación de MGMT, los pacientes puedan ser candidatos para el tratamiento estándar con quimio/radioterapia, o alternativamente, para la radiación o la monoterapia con TMZ (23-24).

La relación del estado de MGMT con la supervivencia también ha sido ampliamente estudiada en clínica. Los pacientes con un promotor MGMT metilado han mostrado una mayor supervivencia global con una mediana de supervivencia de 21,7 meses en comparación con aquellos que presentan un promotor MGMT no

metilado 12,7 meses de mediana de supervivencia (25). Existen varios estudios con resultados similares, entre ellos destacan los de Brandes y cols. (26) en los que se analiza el estado de metilación de MGMT y la supervivencia de 103 pacientes con GBM. El estudio determinó que aquellos pacientes que presentaban metilación en el promotor de MGMT tenían una media de supervivencia de 46 meses frente a los 17 meses que presentaban aquellos pacientes sin metilación en el promotor de MGMT. Además, se concluye que la metilación, en los pacientes sometidos a radioterapia y TMZ seguido de administración adyuvante de TMZ, fue un factor pronóstico independiente para la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad. Weller y cols., en 2009 (27), analizaron 189 pacientes tratados con radioterapia y TMZ en los que la metilación de MGMT también fue un factor pronóstico significativo mejorando la supervivencia de los pacientes de 6,8 meses a 12,5. El estudio de Spiegl-Kreinecker y cols., (28) muestra un incremento en la supervivencia de 20 meses en aquellos pacientes que no expresan MGMT frente a aquellos en los que si se expresa, cuando los dos grupos de pacientes se someten a un tratamiento con TMZ. Más recientemente, Dalhrot y cols., (29) tras el análisis de muestras de 171 pacientes con GBM obtienen que MGMT es un factor pronóstico independiente en la supervivencia de los pacientes incrementando la supervivencia en 5 meses en aquellos pacientes sin expresión de MGMT.

Sin embargo, a pesar de que estos estudios demuestran una mejor evolución en pacientes que presentaban silenciamiento epigenético del MGMT, existen otros estudios en los que se pone de manifiesto que esta correlación no se cumple en todos los casos, como en el estudio de Hegi y cols., (30) donde no todos los pacientes con GMB que presentaban metilación del promotor de MGMT respondían satisfactoriamente al tratamiento o en el de Wick y cols., donde demuestran que no existen diferencias en el patrón de recurrencia del tumor en base al estado del promotor del gen MGMT (31).

Desafortunadamente, ni los niveles de expresión de la proteína MGMT ni el estado de metilación del promotor MGMT son suficientes para predecir con precisión una respuesta eficaz al tratamiento con TMZ para decidir de antemano si un paciente debe recibir TMZ (32). Lo que sí parece estar claro es que el estado de metilación del promotor de MGMT permanece estable en la mayoría de los

pacientes, lo que indicaría que la resistencia a la TMZ no estaría asociada a cambios en el patrón de metilación del promotor (33).

Los contradictorios resultados obtenidos podrían indicar que la enzima de reparación MGMT no es el único mecanismo de reparación del ADN involucrado en la respuesta al tratamiento con agentes alquilantes en los pacientes con glioblastoma, dando lugar al análisis de otros mecanismos implicados en la reparación del DNA, como el sistema MMR o el sistema BER.

- **Sistema de reparación de errores en el DNA - MMR**

El sistema de reparación de errores (MMR) es un sistema que corrige pares de bases mal emparejados. Este mal emparejamiento puede estar causado por errores de replicación del ADN durante la fase S, incluyendo bucles de inserción o deleción y mutaciones puntuales, que escapan a la corrección por exonucleasas o por recombinación homóloga (34-36).

El sistema MMR está compuesto por varias subunidades que se unen formando heterodímeros para realizar su función. El mecanismo de reparación del DNA por el sistema MMR consta de varias etapas consecutivas (37). La primera etapa consiste en el reconocimiento y unión al error. Esta etapa se lleva a cabo por las subunidades MSH2-MSH6 o MSH2-MSH3 dependiendo del tipo de error que se reconozca. Este heterodímero, recluta al complejo MLH1-PMS2 con quien forma un complejo terciario el cual recluta las proteínas necesarias para producir un gap. La segunda etapa consiste en la escisión llevada a cabo por la exonucleasa EXO1, tras la cual se llega a la tercera etapa consistente en la reparación y ligación por la ligasa LIG1 (38-39).

Hoy en día, se sabe que el sistema MMR está involucrada en el procesamiento del daño en el ADN inducido por agentes alquilantes como la TMZ (35). En los casos donde la enzima MGMT no está presente o si MGMT deja sin reparar los aductos O6-meG inducidos por la TMZ, estos actuarán como bases de codificación errónea durante la siguiente ronda de replicación del ADN. Este O6-meG puede emparejarse con timina y formar un complejo que es reconocido por el sistema MMR, iniciando un proceso de reparación fútil que da como resultado la rotura del ADN. Esta rotura provocaría mecanismos celulares adicionales, incluida la activación de un arresto prolongado del ciclo celular G2, con la consecuente

activación de la apoptosis y la autofagia llevando a la muerte celular. Por lo tanto, si el complejo MMR está mutado o inactivado aumenta la resistencia a la TMZ en los GMB ya que los pares erróneos O6-meG: Timina, pueden no reconocerse lo que conduce a la replicación continua del ADN y a la resistencia al tratamiento con TMZ (36, 40-41).

Diversos estudios *in vitro* han relacionado la resistencia al tratamiento con TMZ con una deficiencia en el sistema MMR en líneas celulares con metilación del promotor de MGMT, es decir, líneas sin expresión de MGMT (13, 42-43). Se sabe que dentro del sistema MMR el gen MSH6 es muy propenso a inactivar mutaciones somáticas e incluso completar la pérdida de expresión después de la quimioterapia con la TMZ (44). En aproximadamente el 25% de los GMB el gen MSH6 se encuentra alterado después del tratamiento con agentes alquilantes como la TMZ, pero no en los GMB sin tratamiento previo o en los tumores recurrentes después de la radioterapia (45). Por lo tanto, una deficiencia de la proteína MSH6, provoca resistencia al tratamiento con TMZ *in vitro* y la restauración de la expresión de dicha proteína conduce a un fenotipo más quimiosensible. Además del gen MSH6, existen estudios que han demostrado que la expresión de MLH1 está relacionada con recurrencia en tumores e incremento de resistencia a TMZ en diferentes líneas de GM (46).

Por otro lado, existen trabajos como el de Maxwell y cols., (2008) (47) en el que no encuentran una relación entre una ausencia de MMR y la resistencia a la TMZ a nivel clínico, lo que lleva a pensar que en esta resistencia a la TMZ deben existir más mecanismos implicados.

- **Sistema de reparación de escisión de base del ADN - BER**

El sistema de reparación de escisión de bases del ADN (BER) consiste en la cooperación de varias proteínas de reparación del ADN para eliminar las bases de ADN dañadas o inapropiadas en un proceso de pasos múltiples. Es la principal vía de eliminación y reparación de nucleótidos dañados generados por especies reactivas de oxígeno, radiación ionizante y agentes alquilantes (14, 48) reparando no solo las modificaciones de bases sino también las roturas del DNA de cadena sencilla (35). El sistema BER desempeña un papel muy importante tanto en las células en división como en las que no se dividen, ya que durante el ciclo celular

pueden ocurrir diferentes tipos de daños en el ADN como son la oxidación, la desaminación y la hidrólisis espontánea (49). Más el 90% de las metilaciones causadas por la TMZ son las metilaciones N3-meA y N7-meG, ambas reparadas por el sistema BER, de este modo BER está implicado en los mecanismos de resistencia a la TMZ. Aunque las lesiones N3 son fatales si no se reparan, las lesiones N7 no parecen ser marcadamente citotóxicas. Las metilaciones de N3-meA y N7-meG son mucho más comunes que la metilación de O6-meG, sin embargo, MGMT y MMR parecen ser vías con más importancia en la resistencia a la TMZ que BER (11, 36). Estas lesiones, reparadas rápida y eficientemente por el sistema BER, se vuelven altamente citotóxicas cuando este sistema está interrumpido.

Dentro de este sistema BER, la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) es una proteína clave para la señalización exitosa del daño en el ADN. Aunque esta proteína se expresa de forma constitutiva, se activa en respuesta al daño en el ADN (50). Al unirse al ADN, esta enzima sintetiza poli (ADP-ribosa) (PAR) a partir de NAD+, que es esencial para el reclutamiento de las proteínas del sistema BER y la consecuente reparación del ADN. La inhibición de PARP aumenta la frecuencia de roturas de cadenas de ADN, por lo que las células deficientes en PARP son hipersensibles a los agentes carcinogénicos (51).

La inhibición de PARP mejora la citotoxicidad de las lesiones normalmente reparadas por el sistema BER mejorando así la citotoxicidad producida por la TMZ *in vitro* e *in vivo* (35). Por lo tanto, la interrupción del sistema BER mediante la inhibición de PARP proporciona un medio para superar la resistencia a la TMZ (52-53).

- **Células madre tumorales de Glioblastoma – GSC**

La resistencia del GMB al tratamiento puede explicarse también por la presencia de células madre tumorales (GSC) que se encuentran entre la población celular del tumor. Estas GSC son las células tumorales que poseen un mayor nivel de proliferación entre todas las células del GMB (54) y residen en un microambiente especial denominado nicho. Este nicho proporciona condiciones favorables para su mantenimiento y supervivencia y les permite interactuar con células no tumorales y células de la matriz sin ser reconocidas por el sistema inmune del paciente (55). Lo que diferencia a estas células de las células madre

normales, es su alto contenido en proteínas asociadas con la proliferación, migración, reparación del ADN, resistencia a la radiación y quimioterapia, supervivencia e invasión (56). Gracias a esto presentan, entre otras, resistencia al estrés redox, capacidad activa de reparación del ADN y expresión de varios transportadores ABC que son capaces de expulsar el fármaco antitumoral fuera de la célula.

Está demostrado que las GSC expresan una mayor cantidad de canales transportadores ABC que las células tumorales diferenciadas. Uno de los principales transportadores sobreexpresados es el ABCG2, que parece interactuar con metaloproteinasas de la matriz, lo que desencadena un aumento en la migración celular y la invasión (57-58).

Diferentes autores han demostrado que las GSC presentan autorrenovación en ensayos de neuroesferas, presentan un mayor potencial tumorigénico *in vivo* en comparación con células tumorales y pueden diferenciarse a células que expresan marcadores astrocíticos, oligodendrocíticos y neuronales. También se ha demostrado su implicación en la resistencia tanto a la quimioterapia como a la radioterapia (59-61).

Todas estas características hacen que tras el tratamiento de quimioradioterapia de los pacientes con GMB las GSC sobrevivan, lo que permite que el tumor siga proliferando (62) y que puedan contribuir a la recidiva o a las metástasis a distancia siendo un objetivo potencial para mejorar la eficacia terapéutica y el pronóstico en este tumor (63).

- **Resistencia adquirida**

La resistencia farmacológica adquirida se desarrolla como consecuencia de la presión selectiva en presencia de un agente quimioterapéutico. La quimiorresistencia adquirida puede ser una consecuencia de cambios genéticos y epigenéticos inducidos por fármacos en células neoplásicas. Entre estos cambios se incluye la inducción y selección de genes que confieren una ventaja en la supervivencia, o la selección de clones celulares resistentes preexistentes (64). Dentro de las alteraciones que se pueden producir encontramos aumento del eflujo del fármaco mediante bombas de membrana que expulsan activamente agentes quimioterapéuticos, inactivación del fármaco intracelular, tolerancia a las lesiones

del ADN y alteración de los genes relacionados con la apoptosis, entre otros (65). En los tumores como el GMB esta resistencia es muy importante ya que se trata de un tumor muy heterogéneo en el que tras el tratamiento se pueden estar seleccionando aquellas células resistentes al mismo que son las que posteriormente darán lugar a metástasis o recidivas (2, 60).

Conclusiones

A pesar de todos los avances en la investigación oncológica, el tratamiento de pacientes con GMB sigue siendo uno de los mayores desafíos a nivel mundial. El tratamiento actual de estos pacientes, comienza con una resección quirúrgica seguido de una radio/quimioterapia adyuvante con TMZ. Aunque esta es la mejor opción hasta el momento, existen numerosos pacientes en los que el tratamiento falla debido a fenómenos de resistencia. El tratamiento de los tumores del sistema nervioso está limitado por la presencia de la barrera hematoencefálica, además de ser tumores muy heterogéneos que presentan resistencia mediada por proteínas como MGMT considerada factor pronóstico al tratamiento, o mecanismos de reparación génica como son MMR y BER. Además, existen datos que respaldan el papel crítico de las GCS en la progresión del tumor a lo que debemos sumarle una resistencia adquirida por las propias células tumorales expuestas al fármaco. Por todo esto, se están realizado numerosos estudios para poder determinar por un lado en qué medida la combinación de estos mecanismos es la que produce la resistencia frente al tratamiento y por otro, el estudio de posibles dianas moleculares para generar una mayor supervivencia de los pacientes y, por lo tanto, el éxito en el tratamiento.

Bibliografía:

1. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. (2002). Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. Radiother Oncol. 64(3), 259-273.

2. Huse JT, Holland EC. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. Nat Rev Cancer. 10(5), 319-331.

3. Instituto Nacional del Cáncer (https://www.cancer.gov/)

4. Ohgaki H, Kleihues P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. Cancer Sci. 100(12), 2235–2241.

5. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. (2012). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. Neuro-Oncol. 14 Suppl 5:v1-49.

6. Alifieris C, Trafalis DT. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. Pharmacol Ther. 152:63-82.

7. Urbanska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. (2014). Glioblastoma multiforme – an overview. Contemp Oncol. 18, 307–312.

8. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev. 21(21), 2683-2710.

9. Ellor SV, Pagano-Young TA, Avgeropoulos NG. (2014). Glioblastoma: background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. J Law Med Ethics. 42, 171–182.

10. Koukourakis GV, Kouloulias V, Zacharias G, Papadimitriou C, Pantelakos P, Maravelis G, Fotineas A, Beli I, Chaldeopoulos D, Kouvaris J. (2009). Temozolomide with Radiation Therapy in high grade Brain Gliomas: pharmaceuticals considerations and efficacy; a review article. Molecules. 14(4):1561-77

11. Yan Y, Xu Z, Dai S, Qian L, Sun L, Gong Z. (2016). Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. J Exp Clin Cancer Res. 35, 1–14.

12. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 352, 987–996.

13. Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, Caba O, Cabeza L, Berdasco M, Gónzalez B, Melguizo C. (2015). Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. PLoS One. 10(10):e0140131.

14. Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, De Vecchis L. (2007). Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc. 56(4):275-87.

15. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME. (2010). MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?. Nat Rev Neurol. 6,39-51

16. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. N Engl J Med. 343(19):1350-4.

17. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. Cancer Res. 59(4):793-7.

18. Blough MD, Zlatescu MC, Cairncross JG. (2007). O6-methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells. Cancer Res. 67(2):580-4.

19. Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Grogan PT, Lamont JD, Decker PA, Wu W, James CD, Sarkaria JN. (2009). Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. Neuro Oncology. 11, 281–291

20. Thon N, Kreth S, Kreth FW. (2013). Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. OncoTargets Ther. 6, 1363–1372.

21. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med. 352(10):997–1003.

22. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol. 10(5):459–466.

23. Taylor JW, Schiff D. (2015). Treatment considerations for MGMT-unmethylated glioblastoma. Curr Neurol Neurosci Rep. 15, 507.

24. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, Cohen-Jonathan-Moyal E, Frappaz D, Henriksson R, Balana C, Chinot O, Ram Z, Reifenberger G, Soffietti R, Wick W. (2014). EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. Lancet Oncol. 15, e395–403.

25. Thon N, Eigenbrod S, Grasbon-Frodl EM, Lutz J, Kreth S, Popperl G, Belka C, Kretzschmar HA, Tonn JC, Kreth FW. (2011). Predominant influence of MGMT methylation in non-resectable glioblastoma after radiotherapy plus temozolomide. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 82, 441–446.

26. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. (2008) Glioblastoma in adults. Crit Rev Oncol Hematol. 67(2):139-52.

27. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, Heese O, Krex D, Nikkhah G, Pietsch T, Wiestler O, Reifenberger G, von Deimling A, Loeffler M. (2009). Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 27(34):5743-50.

28. Spiegl-Kreinecker S, Pirker C, Filipits M, Lötsch D, Buchroithner J, Pichler J, Silye R, Weis S, Micksche M, Fischer J, Berger W. (2010). O6-Methylguanine DNA methyltransferase protein expression in tumor cells predicts outcome of temozolomide therapy in glioblastoma patients. Neuro-Oncol. 12(1):28-36.

29. Dahlrot RH, Dowsett J, Fosmark S, Malmström A, Henriksson R, Boldt H, de Stricker K, Sørensen MD, Poulsen HS, Lysiak M, Söderkvist P, Rosell J, Hansen S, Kristensen BW. (2018). Prognostic value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression in glioblastoma excluding nontumour cells from the analysis. Neuropathol Appl Neurobiol. 44(2):172-184.

30. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. (2008). Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with

clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. J Clin Oncol. 26(25):4189-99.

31. Wick W, Stupp R, Beule AC, Bromberg J, Wick A, Ernemann U, Platten M, Marosi C, Mason WP, van den Bent M, Weller M, Rorden C, Karnath HO. (2008). A novel tool to analyze MRI recurrence patterns in glioblastoma. Neuro Oncol. 10(6), 1019–1024.

32. Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Grogan PT, Lamont JD, Decker PA, Wu W, James CD, Sarkaria JN. (2009). Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. Neuro Oncology. 11, 281–291.

33. Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M, Schackert G, Kreth FW, Pietsch T, Löffler M, Weller M, Reifenberger G, Tonn JC. (2011). Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. Int J Cancer. 129(3),659–670.

34. Jacob S, Praz F. (2002). DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. Biochimie. 84(1):27-47.

35. Kinsella TJ. (2009). Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. Clin Cancer Res. 15, 1853–1859.

36. Messaoudi K, Clavreul A, Lagarce F. (2015). Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. Drug Discov Today. 20, 899–905.

37. Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. Prog Neurobiol. 94(2):166-200.

38. Liu L, Gerson SL. (2006). Targeted modulation of MGMT: clinical implications. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 12(2):328-31.

39. Zhang J, Stevens MFG, Bradshaw TD. (2012) Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. Curr Mol Pharmacol. 5(1):102-14.

40. Johannessen TC, Bjerkvig R, Tysnes BB. (2008). DNA repair and cancer stem-like cells-potential partners in glioma drug resistance?. Cancer Treat Rev. 34(6), 558–567.

41. Thomas A, Tanaka M, Trepel J, Reinhold WC, Rajapakse VN, Pommier Y. (2017). Temozolomide in the Era of Precision Medicine. Cancer Res. 77(4):823-826.

42. Cancer Genome Atlas Research Network. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature 455(7216), 1061–1068.

43. Happold C, Roth P, Wick W, Schmidt N, Florea AM, Silginer M, Reifenberger G, Weller M. (2012). Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. J Neurochem. 122(2):444-55.

44. Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB, Batchelor TT, Futreal PA, Stratton MR, Curry WT, Iafrate AJ, Louis DN. (2007). Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. Clin Cancer Res. 13(7), 2038–2045.

45. Yip S, Miao J, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL, Louis DN. (2009). MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. Clin. Cancer Res. 15(14), 4622–4629.

46. Shinsato Y, Furukawa T, Yunoue S, Yonezawa H, Minami K, Nishizawa Y, Ikeda R, Kawahara K, Yamamoto M, Hirano H, Tokimura H, Arita K. (2013). Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma. Oncotarget. 4(12):2261-70.

47. Maxwell JA, Johnson SP, McLendon RE, Lister DW, Horne KS, Rasheed A, Quinn JA, Ali-Osman F, Friedman AH, Modrich PL, Bigner DD, Friedman HS. (2008). Mismatch repair deficiency does not mediate clinical resistance to temozolomide in malignant glioma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 14(15):4859-68.

48. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. (2001). Human DNA repair genes. Science. 291(5507), 1284-1289.

49. Iyama T, Wilson DM. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. DNA Repair. 12, 620–636.

50. Dantzer F, Ame JC, Schreiber V, Nakamura J, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. Methods Enzymol. 409, 493-510.

51. Aguilar-Quesada R, Muñoz-Gámez JA, Martín-Oliva D, Peralta-Leal A, Quiles-Pérez R, Rodríguez-Vargas JM, Ruiz de Almodóvar M, Conde C, Ruiz-Extremera A, Oliver FJ. (2007). Modulation of transcription by PARP-1: consequences in carcinogenesis and inflammation. Curr Med Chem. 14(11), 1179-1187.

52. Curtin NJ, Wang LZ, Yiakouvaki A, Kyle S, Arris CA, Canan-Koch S, Webber SE, Durkacz BW, Calvert HA, Hostomsky Z, Newell DR. (2004). Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells. Clin Cancer Res. 10(3), 881-889.

53. Tentori L, Graziani G. (2009). Recent approaches to improve the antitumor efficacy of temozolomide. Curr Med Chem. 16(2), 245-257.

54. Abou‐Antoun TJ, Hale JS, Lathia JD and Dombrowski SM. (2017). Brain cancer stem cells in adults and children: Cell biology and therapeutic implications. Neurotherapeutics. 14: 372‐384.

55. Plaks V, Kong N, Werb Z. (2015). The cancer stem cell Niche: how essential is the Niche in regulating stemness of tumor cells?. Cell stem cell. 16, 225–238.

56. Bryukhovetskiy A, Shevchenko V, Kovalev S, Chekhonin V, Baklaushev V, Bryukhovetskiy I and Zhukova M. (2014). To the novel paradigm of proteome‐based cell therapy of tumors: Through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissue‐specific stem cells of humans. Cell Transplant 23 (Suppl 1): S151‐S170.

57. Auffinger B, Spencer D, Pytel P, Ahmed AU, Lesniak MS. (2015). The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. Expert Rev Neurother. 15, 741–752.

58. Jackson M, Hassiotou F, Nowak A. (2015). Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. Carcinogenesis. 36, 177–185.

59. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res. 64(19), 7011–7021.

60. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. Nature. 432(7015), 396–401.

61. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature. 444(7120), 756–760.

62. Kim SS, Harford JB, Pirollo KF, Chang EH. (2015). Effective treatment of glioblastoma requires crossing the blood-brain barrier and targeting tumors including cancer stem cells: the promise of nanomedicine. Biochem Biophys Res Commun. 468, 485–489.

63. Yoshida GJ, Saya H. (2016). Therapeutic strategies targeting cancer stem cells. Cancer Sci. 107, 5–11.

64. Alvino E, Castiglia D, Caporali S, Pepponi R, Caporaso P, Lacal PM, Marra G, Fischer F, Zambruno G, Bonmassar E, Jiricny J, D'Atri S. (2006). A single cycle of treatment with temozolomide, alone or combined with O-6-benzylguanine, induces strong chemoresistance in melanoma cell clones in vitro: Role of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase and the mismatch repair system. Int J Oncol. 29(4), 785-797.

65. Bradshaw TD, Chua MS, Orr S, Matthews CS, Stevens MF. (2008). Mechanisms of acquired resistance to 2-(4-Amino-3-methylphenyl)benzothiazole in breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat. 110(1), 57-68.

Capítulo 9

Nanomedicina en el tratamiento del glioblastoma multiforme

Cabeza L, Perazzoli G, Hernández R, Ortiz R, Melguizo C, Prados JC.

Resumen

El glioblastoma multiforme (GBM) es un tumor cerebral poco frecuente en la población mundial. Sin embargo, a pesar de su baja incidencia, debido a su gran agresividad y la escasa eficiencia del tratamiento, sigue siendo uno de los más investigados. El fármaco que se suele utilizar en el tratamiento por quimioterapia es la temozolamida, que puede atravesar la barrera hematoencefálica. Este fármaco produce daños alquilantes en el ADN que dan lugar a una parada del ciclo celular y finalmente a apoptosis. Sin embargo, además de los efectos secundarios que produce, existen diferentes mecanismos de resistencia al tratamiento que hacen que este fármaco sea inefectivo. Así, la nanomedicina ofrece nuevas posibilidades para mejorar el tratamiento de esta patología. Estos nuevos tratamientos se basan en la utilización de nanoformulaciones o nanopartículas como vehículos de diferentes sustancias. Pueden ser funcionalizadas para permitir su paso a través de la barrera hematoencefálica y dirigidas de forma específica a determinados tipos celulares como las células tumorales. Una vez que alcanzan la célula tumoral, liberan la molécula transportada ejerciendo de forma muy específica su efecto citotóxico y/o citostático. Las estrategias seguidas se basan en la funcionalización de las nanopartículas con determinadas moléculas como el péptido de la transferrina, apolipoproteínas o la clorotoxina, cuyos receptores están sobreexpresados en la barrera hematoencefálica e incluso también en las células tumorales. Otra de las estrategias es la de cargar las nanopartículas con moléculas que permitan silenciar la resistencia a fármacos antitumorales como son ARN silenciadores de moléculas clave implicadas en la resistencia o sustancias como la O_6-bencilguanina. La nanomedicina por tanto abre un nuevo campo muy amplio en la búsqueda de un tratamiento más efectivo y que permita una mayor supervivencia en pacientes con GMB.

Introducción

- **Glioblastoma multiforme**

Los gliomas son los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) más comunes, representando el 80% de estos tumores (Figura 1). Se clasifican según su célula de origen y su infiltración cerebral en oligoastrocitomas, oligodendrogliomas y astrocitomas (1). Dentro de estos últimos, se encuentra el glioblastoma multiforme (GBM) (aproximadamente la mitad de los casos) siendo el más agresivo y letal entre los tumores cerebrales con una supervivencia media de unos 9-12 meses tras el diagnóstico (2–5). De manera que, aunque es poco frecuente con una incidencia mundial menor de 10 por cada 100.000 personas, su baja supervivencia lo convierte en uno de los más agresivos (6). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los tumores del SNC en una escala de malignidad del I al IV según criterios histopatológicos, considerándose a los gliomas dentro del grupo IV, que se caracteriza por su alta agresividad, invasividad, proliferación, angiogénesis y por su mal pronóstico (1, 7). Podemos distinguir dos tipos según su origen, de manera que el 90-95% de los casos son diagnosticados como GBM primario mientras que otros tipos de astrocitomas de grupos inferiores pueden llegar a ser GBM, en este caso secundario (10-5% de los casos aproximadamente). Aunque son indistinguibles morfológicamente, tienen patrones genéticos diferentes (1, 8). El GBM suele aparecer en la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales, sobre todo en la región supratentorial y dispersarse desde ahí a estructuras adyacentes (6, 9, 10).

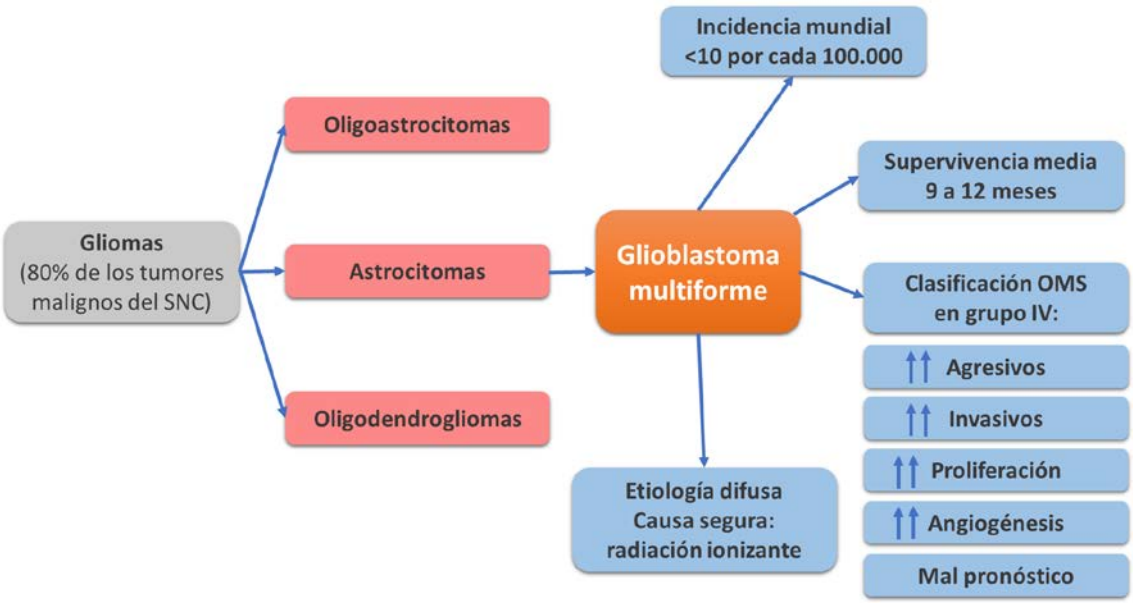


Fig 1. Glioblastoma multiforme. Aspectos generales.

La etiología de este tipo de tumor no está clara aún hoy día. Solo un 1% de estos tumores se han asociado a antecedentes familiares (11). Podría existir relación en la aparición del GBM con la exposición a radiación ionizante, ciertos metales, campos electromagnéticos, el tabaquismo, algunas sustancias como los pesticidas y algunos trabajos como la fabricación de caucho sintético o la producción y refinación del petróleo (12, 13), aunque la única que está confirmada es la exposición a radiación ionizante (14). En cuanto a los síntomas, pueden ser de dos tipos: relacionados con el incremento de la presión intracraneal y específicos de la localización. Todo esto produce síntomas muy diversos, entre los provocados por el aumento de la presión intracraneal, los más frecuentes son cefaleas, mareos y vómitos, siento el más grave las hernias cerebrales. Los síntomas relacionados con la localización dependen de la región en la que se asienten: déficit neurológico y motor en los tumores frontales, visual en los occipitales y afasia en los temporales (Tabla 1) (6, 15).

Tabla 1. Sintomatología del GBM asociada a la localización del tumor.

Localización del tumor	Síntomas asociados
Lóbulo frontal	Irritabilidad, depresión, trastornos psíquicos Incontinencia de esfínteres Crisis parciales Dificultad en la pronunciación de palabras recordadas
Lóbulo parietal	Incapacidad de procesar informaciones que llegan a través de los sentidos Incapacidad de comprender conceptos matemáticos, números, de expresar ideas escribiendo y de leer
Lóbulo temporal	Alucinaciones auditivas, olfatorias y vertiginosas Incapacidad de comprender y recordar el lenguaje hablado (Afasia de Wernicke) Pérdida de la visión de un cuarto del campo visual
Lóbulo occipital	Pérdida de la visión de la mitad del campo visual o de un cuarto Incapacidad de comprender y reconocer estímulos visuales Percepción de los objetos más pequeños o más grandes de lo que son en realidad y con formas alteradas Síndrome de Balint y de Anton-Babinski
Ventrículos laterales	Hipertensión intracraneal
Área diencefálica	Hipertensión intracraneal Síndromes neuroendocrinos Alteraciones de la sensibilidad profunda Dedos de la mano hiperflexionados y uñas estriadas y curvadas (mano talámica) Alteraciones del campo visual
Región profunda de los hemisferios	Disminución de la fuerza de los músculos (paresia espástica) Hipertensión intracraneal
Cuerpo calloso	Síndrome de Sperry o de desconexión del cuerpo calloso Trastornos de la personalidad
Nervio óptico	Ojos prominentes (exoftalmos) Alteraciones del campo visual, ceguera transitoria (amaurosis) Hipertensión intracraneal (obstrucción foramen de Monro)
Región selar y paraselar	Pérdida de la visión de la mitad del campo visual Síndromes neuroendocrinos Hipertensión intracraneal
Tronco del encéfalo	Trastornos de la deglución y oculomotores Descoordinación en los movimientos Aumento de los reflejos, signo de Babinski positivo, parálisis parcial o disminución de la fuerza de los músculos Hipertensión intracraneal
IV ventrículo	Síndrome hipertensión intracraneal precoz

- **Tratamiento estándar del glioblastoma multiforme y sus limitaciones**

El tratamiento del GBM incluye en primer lugar la cirugía siendo sus objetivos, la obtención de un diagnóstico histológico y conseguir la máxima reducción del volumen tumoral con la mínima morbilidad posible. En segundo lugar, se administra a los pacientes radioterapia y quimioterapia (9, 16, 17). Sin embargo, debido su agresividad, estos tumores se expanden rápidamente y suele producir recidivas después del tratamiento. Por ello las terapias actuales son poco efectivas y los pacientes presentan muy mal pronóstico (15, 18).

El fármaco más empleado en la quimioterapia del GBM es la temozolamida, un agente alquilante con buena absorción y tolerabilidad que tiene capacidad radiosensibilizante y es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica aumentando de manera significativa la supervivencia de los pacientes (19). Promueve la metilación de algunas bases del ADN, fundamentalmente de O^6 y N_7 de la guanina, dando lugar a una parada en la fase G_2/M que conduce a la muerte celular (Figura 2) (20–22).

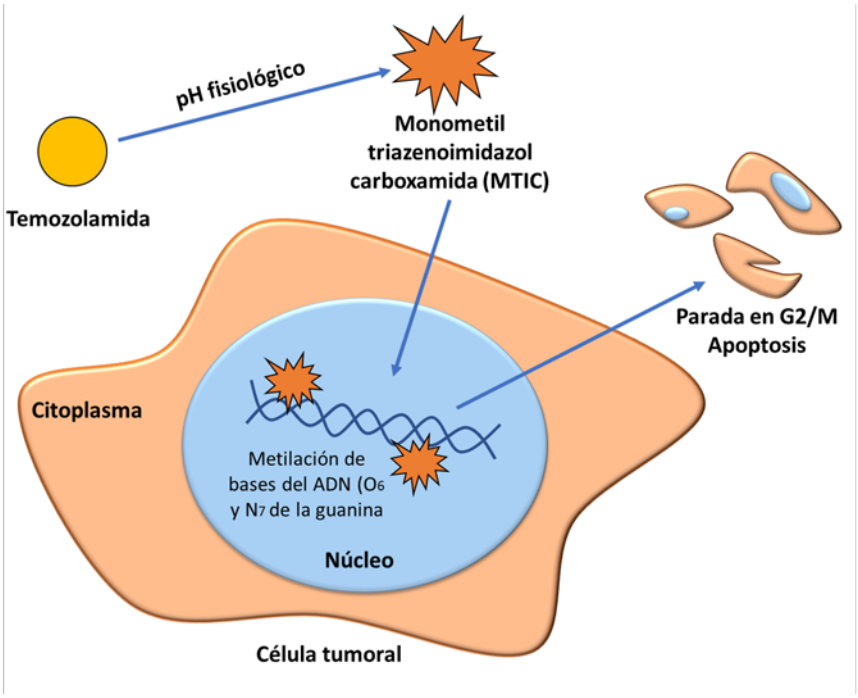


Fig 2. Mecanismo de acción de la temozolamida. Cuando la temozolamida se encuentra en un ambiente de pH fisiológico se transforma rápidamente en su metabolito activo el monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC), que tiene un efecto alquilante sobre el ADN produciendo una parada de ciclo en la fase G2/M que conduce a la muerte celular programada de la célula.

En cuanto a las limitaciones que encontramos en el tratamiento por quimioterapia del GBM, la principal son los numerosos efectos secundarios que produce la temozolamida, como son linfopenia, mielosupresión, dolores de cabeza, náuseas o fatiga (23). Además, muchos GBM son resistentes al tratamiento por quimioterapia. La principal vía de resistencia a la quimioterapia por temozolamida es el estado de metilación del promotor del gen de la O^6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) y por lo tanto sus niveles de expresión (24, 25). Esta enzima repara los errores del ADN y cuando su promotor se encuentra metilado las células tumorales del glioma son más sensibles a la temozolamida, de manera que los pacientes que presentan el promotor de MGMT metilado suelen tener una mejor respuesta al tratamiento que se traduce en una mayor supervivencia (25–27). Sin embargo, no es este el único factor que limita la quimioterapia con temozolamida, existen otros mecanismos de reparación del ADN como el "DNA mismatch repair" (MMR) o la reparación por escisión de bases (BER) y mecanismos como la proteína de membrana p-glicoproteína, que expulsa el fármaco al exterior de la célula (22, 28, 29).

La baja efectividad del tratamiento actual del GMB dada su complejidad debido a su localización, a sus características de agresividad e invasividad y a los numerosos mecanismos de resistencia existentes, hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan incrementar la supervivencia de los pacientes afectos de esta patología.

- **Nanomedicina y cáncer**

La nanomedicina, se ha desarrollado en los últimos años como una nueva herramienta en el campo de la oncología, que permite obtener grandes avances tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de esta patología (30). Así, los nanomateriales o nanopartículas pueden utilizarse como transportadores de diferentes sustancias terapéuticas como fármacos antitumorales, aumentando su eficacia y especificidad y reduciendo su toxicidad sistémica e incluso funcionalizarse con núcleos magnéticos útiles en el diagnóstico y en el tratamiento mediante hipertermia del cáncer (31). Una de las principales propiedades de estos sistemas de nanopartículas es que podrían permitir el paso de determinados

fármacos a través de barreras como la hematoencefálica, propiedad especialmente interesante en el caso del tratamiento del GBM.

1. Mecanismo de acción

Una vez que las nanopartículas son inoculadas vía sanguínea, éstas siguen su camino hasta el tejido tumoral. Debido a sus propiedades físico-químicas suelen acumularse con mayor preferencia en los tejidos tumorales respecto a los tejidos sanos por el direccionamiento pasivo o efecto de permeabilidad y retención aumentadas (EPR) (32). De esta manera, las nanopartículas son internalizadas en los tumores debido a que en estos tejidos existe una angiogénesis aberrante, una producción de determinados mediadores vasculares (como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)) y un drenaje linfático deficiente (33–37). Sin embargo, el efecto EPR suele ser bajo en los tumores cerebrales debido a la densa matriz cerebral, con lo que el direccionamiento pasivo puede ser insuficiente para su tratamiento (38). Para incrementar la acumulación de nanopartículas en el tumor, actualmente se utilizan diferentes sistemas que permitan su direccionamiento activo, realizando modificaciones en la nanopartícula que le confieren una mayor especificidad por los tejidos tumorales. Entre estas modificaciones destaca la adición de anticuerpos monoclonales que reconocen de manera específica células tumorales, facilitando el proceso por el que la nanopartícula pueda ser internalizada por endocitosis mediada por receptor (36, 39).

2. Nanopartículas en el tratamiento del GBM

En el caso del tratamiento sistémico de los tumores cerebrales, encontramos la dificultad añadida de que los quimioterápicos deben atravesar la barrera hematoencefálica para poder alcanzar el tumor. La barrera hematoencefálica es un sistema de protección del cerebro de las posibles sustancias tóxicas que son transportadas por la sangre, permitiendo solo de manera muy selectiva el paso de determinadas moléculas. La barrera hematoencefálica está formada por células endoteliales fuertemente unidas con una lámina basal continua no fenestrada (40). Además, en el caso de los tumores cerebrales existe una barrera hematoencefálica tumoral diferente a la barrera normal en cuanto a su función y a su conformación.

Los procesos de angiogénesis permiten que se formen nuevos vasos sanguíneos en el tumor que junto con los existentes proporcionan oxígeno y nutrientes al tumor y además dificultan la llegada de los fármacos antitumorales (41).

La nanomedicina ha intentado elaborar estrategias que permitan traspasar esta barrera y ampliar el abanico de fármacos antitumorales que se puedan utilizar. Una de las estrategias es la de dotar a las nanopartículas de un direccionamiento activo que permita una transcitosis mediada por receptor (Figura 3) (42). Este es el caso de nanopartículas de oro pegiladas cargadas con el fármaco antitumoral doxorrubicina y funcionalizadas con un péptido específico para el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 (LRP1), sobreexpresado tanto en la barrera hematoencefálica como en células tumorales. En ratones portadores de glioma tratados con esta nanopartícula, se pudo observar un incremento en la supervivencia de al menos 2,89 veces en comparación con los ratones control tratados con solución salina (43). Los transportadores de glucosa de la barrera hematoencefálica también han sido utilizados para el transporte de nanomateriales, en concreto liposomas formados a partir de un derivado del colesterol afín a este tipo de receptores (44). También nanopartículas portadoras de apolipoproteína E que facilitan la internalización de las mismas por parte de las células endoteliales de los capilares cerebrales (45). En otros casos esta internalización puede darse de una manera indirecta como con las nanopartículas de poli(butilcianoacrilato) (PBCA) que contienen polisorbato 80. Cuando estas nanopartículas son inoculadas en la sangre el polisorbato 80 podría unirse mediante enlace covalente a diferentes tipos de apolipoproteínas (E, A-I o B100) de la sangre, pudiendo así ser internalizadas por las células endoteliales de los capilares cerebrales (46). Además, estos nanotransportadores pueden estar funcionalizados con ciertas moléculas para que al atravesar la barrera actúen de manera específica sobre las células tumorales. Este es el caso de las nanopartículas de oro portadoras del péptido de la transferrina (Tfpep), que además transportan el profármaco fotodinámico Pc4. Estas nanopartículas han mostrado una mayor internalización celular comparadas con las nanopartículas sin péptido, en la líneas de glioma LN229 y U87 que tienen sobreexpresado el receptor de la transferrina (47). El péptido de la clorotoxina, extraído del veneno de escorpión (48), también ha sido utilizado para funcionalizar nanopartículas portadoras de temozolamida

hacia las líneas celulares de GBM U-118 MG, SF767 y GBM6, consiguiendo una mejor internalización celular del fármaco (2 a 6 veces mayor) y una gran reducción de su dosis inhibitoria al 50% o IC_{50} (50-90%) (49).

En otros estudios las dianas son diferentes. Se ha observado que los macrófagos y células de la microglía asociados a tumores cerebrales (TAMs) son un factor importante en la expansión e invasividad del tumor y por tanto de su pronóstico (50). En este caso se ha comprobado la efectividad en atravesar la barrera hematoencefálica de nanopartículas funcionalizadas con el péptido de la glucoproteína del virus de la rabia y cargadas con el fármaco antitumoral paclitaxel, siendo internalizadas preferentemente por las TAMs sin afectar de manera importante a las neuronas y provocando una disminución del crecimiento tumoral en ratones portadores aproximadamente de 1,3 veces (51). Belhadj y cols. (2017) incorporaron dos ligandos en su nanoformulación de base lipídica (además del fármaco doxorrubicina) para atravesar indistintamente la barrera hematoencefálica normal y la tumoral y actuar de manera específica sobre células tumorales (52). Sus resultados demostraron un incremento del efecto citotóxico y una mayor supervivencia *in vivo* de ratones portadores de gliomas que aumentó hasta 1,94 y 1,65 veces en comparación con los liposomas con solo un ligando. En otros casos la retro-inverso bradiquinina es utilizada para aumentar de forma selectiva la permeabilidad de la barrera hematoencefálica tumoral para permitir una mayor acumulación en los tejidos tumorales de nanopartículas de oro (41).

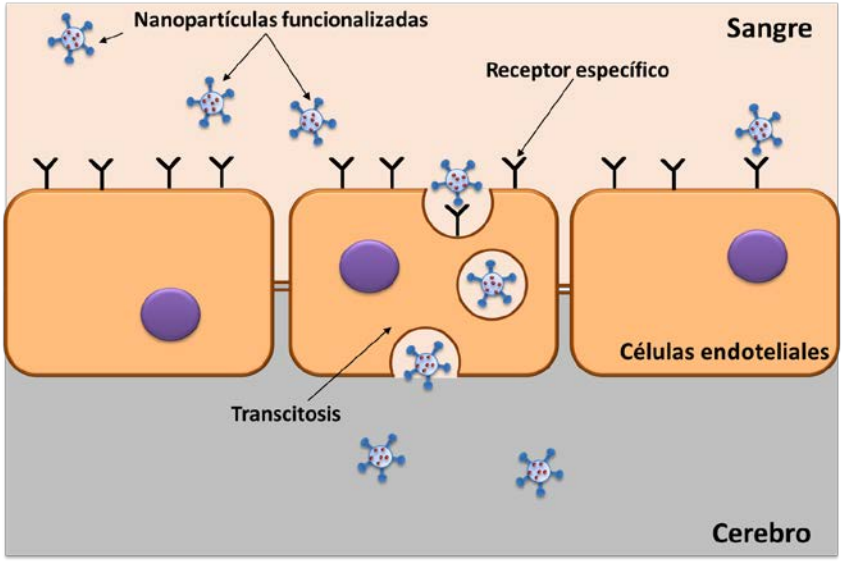


Fig 3. Paso de nanopartículas a través de barrera hematoencefálica mediante transcitosis.

3. Nanopartículas y resistencia a fármacos

Como comentábamos anteriormente, en muchos casos el tratamiento con temozolamida de los pacientes que presentan GBM se ve comprometido por diferentes mecanismos de resistencia, como es la sobreexpresión de MGMT que repara los errores en el ADN que produce la temozolamida. Kim y cols. (2015) han desarrollado una nanopartícula transportadora de temozolamida, funcionalizada con moléculas afines al receptor de la transferrina capaz de transportar ácidos nucleicos, en este caso para incrementar la expresión de p53 (53). En este estudio se ha demostrado que los niveles de expresión de p53 y MGMT están inversamente relacionados, de manera que la sobreexpresión de MGMT puede reducirse aumentando los niveles de p53. Así, las células de GBM resistentes a temozolamida que son tratadas con estas nanopartículas son mucho más sensibles al tratamiento con temozolamida, demostrando que estas nanopartículas pueden superar la resistencia al tratamiento con temozolamida mediante una reducción de los niveles de MGMT.

Las nanopartículas de hierro también han sido usadas para este propósito. Se utilizó el péptido de la clorotoxina que además de tener propiedades antitumorales, permitió funcionalizar las nanopartículas. Éstas además se cargaron con un siARN para silenciar la expresión de MGMT. El tratamiento combinado de estas nanopartículas con temozolamida dio lugar a una mayor disminución del crecimiento del tumor cerebral en ratones portadores en comparación con los ratones que no recibieron el tratamiento silenciador (54).

Los implantes de carmustina o BCNU, fármaco antitumoral, están actualmente indicados para pacientes con gliomas malignos recidivados o recién diagnosticados que han sido sometidos a una resección macroscópicamente completa y que van a recibir radioterapia. Sin embargo, este fármaco actúa produciendo daño alquilante en el ADN, de ahí que su uso también esté limitado debido a la sobreexpresión de MGMT. Quian y cols. (2013) (55) sintetizaron nanopartículas compuestas por poli (ácido láctico-co-glicólico) y quitosano cargadas con BCNU y O_6-bencilguanina, un inhibidor de MGMT (56). Los resultados de este estudio mostraron que las nanopartículas cargadas con los dos compuestos inducían un aumento significativo del efecto antitumoral y una mayor supervivencia en ratas portadoras de glioma inducido con células F98, de 13 días más que el grupo control y de 4 días más que

las ratas que recibieron el tratamiento combinado con fármaco e inhibidor sin ser vehiculizados en las nanopartículas (55). La O_6-bencilguanina no suele utilizarse en clínica debido a que no permeabiliza bien a través de la barrera hematoencefálica, tiene una corta vida media en la circulación y ejerce un efecto aditivo a la mielosupresión producida por la temozolamida (57, 58). Por este motivo, su vehiculización en nanopartículas puede permitir su uso sistémico. En un estudio de (58) la O_6-bencilguanina fue vehiculizada en nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con el péptido de la clorotoxina. En los estudios *in vitro* pudo observarse que el tratamiento con estas nanopartículas producía una disminución de la actividad de MGMT junto con un aumento de la toxicidad de la temozolamida. En los estudios *in vivo* se mostró un aumento en la supervivencia en ratones portadores de glioma de hasta 3 veces en comparación con ratones tratados con nanopartículas sin el inhibidor y los controles, observando también una disminución de los efectos secundarios producidos por la O_6-bencilguanina.

Conclusiones

A pesar de todos los avances en el campo de la oncología de los últimos años, existen patologías como el GBM que todavía constituyen un reto en la búsqueda de un tratamiento efectivo. El GBM, cuyo tratamiento quimioterápico actual está basado en la temozolamida, presenta un mal pronóstico y recidivas debido a la resistencia que estos pacientes desarrollan frente al tratamiento. Además, solo pueden ser utilizados fármacos capaces de traspasar tanto la barrera hematoencefálica normal como la tumoral. La nanomedicina aplicada al tratamiento del cáncer está tratando de desarrollar nuevos tratamientos que mejoren el pronóstico y la supervivencia de los pacientes con GBM. Se están abordando diferentes estrategias siendo las principales el direccionamiento activo de las nanopartículas para poder atravesar la barrera hematoencefálica y su funcionalización para ser dirigidas de forma específica hacia las células tumorales. En este tipo de direccionamiento se utilizan moléculas como apolipoproteínas, el péptido de la transferrina o la clorotoxina. Asimismo, se están desarrollando muchas nanoformulaciones que además de mejorar el direccionamiento del tratamiento antitumoral pretenden silenciar los mecanismos de resistencia a fármacos antitumorales mediante ciertas estrategias como el aumento de los

niveles de p53 o la vehiculización de la O_6-bencilguanina. De esta manera, cada vez aparecen nuevos estudios con resultados muy prometedores en el tratamiento de esta patología que en un futuro podrían constituir una mejora en su tratamiento y por tanto una mayor esperanza de supervivencia para los pacientes.

Bibliografía

1. Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G. (2013). Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 61(1), 25–41.

2. Di Carlo DT, Cagnazzo F, Benedetto N, Morganti R, Perrini P. (2017). Multiple high-grade gliomas: epidemiology, management, and outcome. A systematic review and meta-analysis. Neurosurg Rev. [Epub ahead of print].

3. Ohgaki H (2005). Genetic pathways to glioblastomas. Neuropathol. 25(1), 1–7.

4. Ohgaki H, Kleihues P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. Acta Neuropathol. 109(1), 93–108.

5. Séhédic D, Cikankowitz A, Hindré F, Davodeau F, Garcion E. (2015). Nanomedicine to overcome radioresistance in glioblastoma stem-like cells and surviving clones. Trends Pharmacol Sci. 36(4), 236–252.

6. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. Asian Pac J Cancer Prev. 18(1), 3–9.

7. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol. 114(2), 97–109.

8. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. Cancer Res. 64(19), 6892–6899.

9. Ellor SV, Pagano-Young TA, Avgeropoulos NG. (2014). Glioblastoma: background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. J Law Med Ethics. 42(2), 171–182.

10. Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, Hamada J-I. (2011). Aberrant signaling pathways in glioma. Cancers. 3(3), 3242–3278.

11. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. Nat Clin Pract Neurol. 2(9), 494–503.

12. Spinelli V, Chinot O, Cabaniols C, Giorgi R, Alla P, Lehucher-Michel M-P. (2010). Occupational and environmental risk factors for brain cancer: a pilot case-control study in France. Presse Med. 39(2), 35-44.

13. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. Neuro-Oncol. 4(4), 278–299.

14. Ohgaki H. (2009). Epidemiology of brain tumors. Methods Mol Biol. 472, 323–342.

15. Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. (2014). Glioblastoma multiforme - an overview. Contemp Oncol (Pozn). 18(5), 307–312.

16. Karcher S, Steiner H-H, Ahmadi R, Zoubaa S, Vasvari G, Bauer H, Unterberg A, Herold-Mende C. (2006). Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas. Int J Cancer. 118(9), 2182–2189.

17. Wen PY, Schiff D, Kesari S, Drappatz J, Gigas DC, Doherty L. (2006). Medical management of patients with brain tumors. J Neurooncol. 80(3), 313–332.

18. Castro MG, Candolfi M, Kroeger K, King GD, Curtin JF, Yagiz K, Mineharu Y, Assi H, Wibowo M, Ghulam Muhammad AK, Foulad D, Puntel M, Lowenstein PR. (2011). Gene therapy and targeted toxins for glioma. Curr Gene Ther. 11(3), 155–180.

19. Mirimanoff R-O, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann R-D, Fisher B, Reni M, Brandes AA, Curschmann J, Villa S, Cairncross G, Allgeier A, Lacombe D, Stupp R. (2006). Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. J Clin Oncol. 24(16), 2563–2569.

20. Saleem A, Brown GD, Brady F, Aboagye EO, Osman S, Luthra SK, Ranicar AS, Brock CS, Stevens MF, Newlands E, Jones T, Price P. (2003). Metabolic activation of temozolomide measured in vivo using positron emission tomography. Cancer Res. 63(10), 2409–2415.

21. Scott J, Tsai Y-Y, Chinnaiyan P, Yu H-HM. (2011). Effectiveness of radiotherapy for elderly patients with glioblastoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 81(1), 206–210.

22. Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, Caba O, Cabeza L, Berdasco M, Gónzalez B, Melguizo C. (2015). Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. PloS One. 10(10), e0140131.

23. Sengupta S, Marrinan J, Frishman C, Sampath P. (2012). Impact of temozolomide on immune response during malignant glioma chemotherapy. Clin Dev Immunol. 2012, 831090.

24. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. N Engl J Med. 343(19), 1350–1354.

25. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med. 352(10), 997–1003.

26. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. (2008). Glioblastoma in adults. Crit Rev Oncol Hematol. 67(2), 139–152.

27. Thon N, Kreth S, Kreth F-W. (2013). Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. OncoTargets Ther. 6, 1363–1372.

28. Kinsella TJ. (2009). Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. Clin Cancer Res. 15(6), 1853–1859.

29. Messaoudi K, Clavreul A, Lagarce F. (2015). Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. Drug Discov Today. 20(7), 899–905.

30. Tong R, Kohane DS. (2016). New Strategies in Cancer Nanomedicine. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 56, 41–57.

31. Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. (2017). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. Nat Rev Cancer. 17(1), 20–37.

32. Matsumura Y, Maeda H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res. 46, 6387–6392.

33. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. (2014). Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. Adv Drug Deliv Rev. 66, 2–25.

34. Maeda H. (2012). Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. J Control Release. 164(2), 138–144.

35. Maeda H, Fang J, Inutsuka T, Kitamoto Y. (2003). Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. Int Immunopharmacol. 3(3), 319–328.

36. Maeda H, Tsukigawa K, Fang J. (2016). A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic Therapy--Problems, Solutions, and Prospects. Microcirc. 23(3), 173–182.

37. Nakamura H, Fang J, Jun F, Maeda H. (2015). Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls. Expert Opin Drug Deliv. 12(1), 53–64.

38. Kim S-S, Harford JB, Pirollo KF, Chang EH. (2015). Effective treatment of glioblastoma requires crossing the blood-brain barrier and targeting tumors including cancer stem cells: The promise of nanomedicine. Biochem Biophys Res Commun. 468(3), 485–489.

39. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. (2008). Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. Adv Drug Deliv Rev. 60(15), 1615–1626.

40. Hendricks BK, Cohen-Gadol AA, Miller JC. (2015). Novel delivery methods bypassing the blood-brain and blood-tumor barriers. Neurosurg Focus. 38(3), E10.

41. Su B, Wang R, Xie Z, Ruan H, Li J, Xie C, et al. (2018). Effect of Retro-Inverso Isomer of Bradykinin on Size-Dependent Penetration of Blood-Brain Tumor Barrier. Small. 14(7), 1–9.

42. Kim S-S, Rait A, Kim E, Pirollo KF, Nishida M, Farkas N, Dagata JA, Chang EH. (2014). A nanoparticle carrying the p53 gene targets tumors including cancer stem cells, sensitizes glioblastoma to chemotherapy and improves survival. ACS Nano. 8(6), 5494–5514.

43. Ruan S, Yuan M, Zhang L, Hu G, Chen J, Cun X, Zhang Q, Yang Y, He Q, Gao H. (2015). Tumor microenvironment sensitive doxorubicin delivery and release to glioma using angiopep-2 decorated gold nanoparticles. Biomaterials. 37, 425–435.

44. Qin Y, Fan W, Chen H, Yao N, Tang W, Tang J, Yuan W, Kuai R, Zhang Z, Wu Y, He Q. (2010). In vitro and in vivo investigation of glucose-mediated brain-targeting liposomes. J Drug Target. 18(7), 536–549.

45. Wagner S, Zensi A, Wien SL, Tschickardt SE, Maier W, Vogel T, Worek F, Pietrzik CU, Kreuter J, von Briesen H. (2012). Uptake mechanism of ApoE-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood-brain barrier model. PloS One. 7(3), e32568.

46. Tian X-H, Lin X-N, Wei F, Feng W, Huang Z-C, Wang P, Ren L, Diao Y. (2011). Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. Int J Nanomedicine. 6, 445–452.

47. Dixit S, Novak T, Miller K, Zhu Y, Kenney ME, Broome A-M. (2015). Transferrin receptor-targeted theranostic gold nanoparticles for photosensitizer delivery in brain tumors. Nanoscale. 7(5), 1782–1790.

48. Lyons SA, O'Neal J, Sontheimer H. (2002). Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. Glia. 39(2), 162–173.

49. Fang C, Wang K, Stephen ZR, Mu Q, Kievit FM, Chiu DT, Press OW, Zhang M. (2015). Temozolomide nanoparticles for targeted glioblastoma therapy. ACS Appl Mater Interfaces. 7(12), 6674–6682.

50. Kennedy BC, Maier LM, D'Amico R, Mandigo CE, Fontana EJ, Waziri A, Assanah MC, Canoll P, Anderson RC, Anderson DE, Bruce JN. (2009). Dynamics of central and peripheral immunomodulation in a murine glioma model. BMC Immunol. 10, 11.

51. Zou L, Tao Y, Payne G, Do L, Thomas T, Rodriguez J, Dou H. (2017). Targeted delivery of nano-PTX to the brain tumor-associated macrophages. Oncotarget. 8(4), 6564–6578.

52. Belhadj Z, Ying M, Cao X, Hu X, Zhan C, Wei X, Gao J, Wang X, Yan Z, Lu W. (2017). Design of Y-shaped targeting material for liposome-based multifunctional glioblastoma-targeted drug delivery. J Control Release. 255, 132–141.

53. Kim S-S, Rait A, Kim E, Pirollo KF, Chang EH. (2015). A Tumor-targeting p53 Nanodelivery System Limits Chemoresistance to Temozolomide Prolonging Survival in a Mouse Model of Glioblastoma Multiforme. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 11(2), 301–311.

54. Yoo B, Ifediba MA, Ghosh S, Medarova Z, Moore A. (2014). Combination treatment with theranostic nanoparticles for glioblastoma sensitization to TMZ. Mol Imaging Biol. 16(5), 680–689.

55. Qian L, Zheng J, Wang K, Tang Y, Zhang X, Zhang H, Huang F, Pei Y, Jiang Y. (2013). Cationic core-shell nanoparticles with carmustine contained within O6-benzylguanine shell for glioma therapy. Biomaterials. 34(35), 8968–8978.

56. Tomaszowski K-H, Hellmann N, Ponath V, Takatsu H, Shin H-W, Kaina B. (2017). Uptake of glucose-conjugated MGMT inhibitors in cancer cells: role of flippases and type IV P-type ATPases. Sci Rep. 7(1), 13925.

57. Roy SK, Gupta E, Dolan ME. (1995). Pharmacokinetics of O6-benzylguanine in rats and its metabolism by rat liver microsomes. Drug Metab Dispos. 23(12), 1394–1399.

58. Stephen ZR, Kievit FM, Veiseh O, Chiarelli PA, Fang C, Wang K, Hatzinger SJ, Ellenbogen RG, Silber JR, Zhang M. (2014). Redox-responsive magnetic nanoparticle for targeted convection-enhanced delivery of O6-benzylguanine to brain tumors. ACS Nano. 8(10), 10383–10395.

Capítulo 10

Modulación de la sensibilización de los nociceptores C por el receptor sigma-1

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

Resumen

Introducción: La sensibilización periférica es producida por algógenos químicos. Mientras que la prostaglandina E2 (PGE2) sensibiliza los nociceptores C peptidérgicos (TRPV1+), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), sensibiliza nociceptores C no peptidérgicos (IB4+). El receptor sigma-1 es una chaperona regulada por ligando y una de sus funciones es frenar la analgesia opiode periférica.

Objetivos: Estudiar si los receptores sigma-1 modulan la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2 y GDNF.

Material y Métodos: Se utilizaron ratones hembra CD1. La PGE2 y el GDNF se administraron de forma intraplantar (i.pl.) y los antagonistas sigma-1 por vía subcutánea (s.c.) e i.pl. La hiperalgesia mecánica inducida por PGE2 o GDNF se evalúo mediante el test de presión de la pata (100 g).

Resultados: La hiperalgesia mecánica inducida por PGE2 fue revertida por los antagonistas sigma-1 S1RA y BD-1063. Este efecto antihiperalgésico fue abolido por el agonista sigma-1 PRE-084, el antagonista opiode periférico naloxona metiodida, así como por el antagonista selectivo μ cyprodime, pero no por el antagonista κ nor-binaltorpimina ni por el antagonista δ naltrindol. Estos resultados indican que los receptores sigma-1 y los receptores μ participan en los efectos del S1RA y del BD-1063. Sin embargo, el antagonismo sigma-1 no alteró la hiperalgesia mecánica inducida por GDNF. Mediante inmunohistoquímica del DRG, determinamos que el agonista μ endógeno endomorfina-2 es producido por los nociceptores TRPV1+ pero no por los nociceptores IB4+, esto podría explicar el

efecto opioide del antagonismo sigma-1 en la hiperalgesia inducida por PGE2, y la ausencia de su efecto en la hiperalgesia inducida por GDNF.

Conclusiones: El antagonismo sigma-1 podría disminuir la hiperalgesia mecánica inducida por la PGE2 a través de la modulación del efecto de endomorfina-2 en las aferentes primarias TRPV1+, mientras que no altera la sensibilización de los nociceptores C no peptidérgicos por el GDNF.

Introducción

La sensibilización periférica es el aumento de la capacidad de respuesta de las neuronas nociceptivas periféricas, y participa en la ganancia sensorial del dolor inflamatorio (1), neuropático (2) y canceroso (3). Este proceso es producido por algógenos químicos liberados por diversos tipos celulares, e incluyen a la prostaglandina E2 (PGE2) y al factor neurotrófico glial (GDNF de sus siglas en inglés), entre otros (1-5).

No todos los sensibilizadores periféricos actúan por el mismo mecanismo. La PGE2 activa receptores de Eicosanoides/Prostanoides produciendo la fosforilación (sensibilización) de los receptores TRPV1 (de sus siglas en inglés Transient Receptor Potential Vanilloid-1), principalmente por la ruta de la PKA (1-4). De hecho, se piensa que los TRPV1 son un integrador molecular de la sensibilización periférica (6). Sin embargo, los TRPV1 no están presentes en todos los nociceptores, situándose casi exclusivamente en neuronas C-peptidérgicas (5, 7). En cambio, las neuronas C-no peptidérgicas expresan otros marcadores moleculares, incluyendo los receptores para GDNF del tipo tirosín-quinasa (5). Estas neuronas no peptidérgicas pueden ser diferenciadas del resto de neuronas sensoriales mediante el marcaje con la isolectina B4 (IB4) (5). La separación entre neuronas C-peptidérgicas y no peptidérgicas no es clara en todas las especies, ya que en la rata hay un solapamiento significativo entre las neuronas TRPV1+ e IB4+, mientras que en el ratón este solapamiento es virtualmente inexistente (7-9), por lo que el ratón es un modelo animal más “puro” (aunque menos estudiado) que permitiría estudiar selectivamente la sensibilización de las diferentes subpoblaciones de nociceptores C usando algógenos específicos.

En el dolor nociceptivo (en ausencia de sensibilización), las neuronas IB4+ y TRPV1+ codifican para estímulos dolorosos diferentes en el ratón: mientras que las neuronas IB4+ codifican para estímulos mecánicos, las TRPV1+ lo hacen para

los estímulos térmicos (7, 9, 10). Sin embargo, en condiciones de sensibilización del sistema nociceptivo esta discriminación del tipo de estímulo por las subpoblaciones de nociceptores podría sufrir variaciones, ya que los antagonistas TRPV1+ reducen la hipersensibilidad mecánica durante el dolor canceroso, inflamatorio, neuropático, así como en modelos de artrosis (6, 11, 12). Según datos iniciales de este proyecto, la PGE2 produce hiperalgesia térmica y mecánica dependiente de neuronas peptidérgicas en el ratón, por lo que este sensibilizador podría ser responsable de que las neuronas TRPV1 fueran capaces de codificar para el estímulo mecánico, al cual son insensibles en condiciones fisiológicas (13).

El receptor sigma-1 es una chaperona regulada por ligando y se localiza en áreas clave para la neurotransmisión dolorosa, incluyendo tanto áreas centrales, como el sistema nervioso periférico (ganglios de la raíz dorsal, o DRG por sus siglas en inglés) (14). El papel del receptor sigma-1 en el dolor a nivel central está muy estudiado, en particular en modelos de dolor neuropático (15). De hecho, se ha desarrollado un antagonista sigma-1 (S1RA) que ha superado recientemente los ensayos clínicos de Fase II para este tipo de dolor (16). Nuestro grupo de investigación ha contribuido a su desarrollo (14, 15 ,17-21).

Curiosamente, hemos demostrado que la concentración del receptor sigma-1 en el DRG es muy superior a la de áreas centrales (14), y la inhibición de este receptor a nivel periférico incrementa la analgesia inducida por fármacos opioides, por lo que la actividad tónica del receptor sigma-1 en la periferia frena la analgesia opioide (14, 18). El antagonismo del receptor sigma-1 periférico abole la hiperalgesia inflamatoria (19) a través de la potenciación de la analgesia periférica inducida por péptidos opioides endógenos (POEs) de producción inmunitaria (20, 21).

Los sensibilizadores periféricos no requieren de la presencia de células inmunitarias para la producción de hiperalgesia, pero los POES no son exclusivos de las células del sistema inmunitario sino que tienen otras fuentes neuronales o no neuronales. De hecho, las mismas neuronas sensoriales periféricas son capaces de producir endomorfina-2 (EM-2) (al menos en la rata), un péptido opioide endógeno con selectividad por el receptor opioide μ (22), en función de su actividad eléctrica y de una manera dependiente de calcio (23, 24).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos si el receptor sigma-1 periférico podría jugar un papel clave en la sensibilización periférica. Y por ello, nuestro objetivo fue estudiar si los receptores sigma-1 modulan la hiperalgesia mecánica inducida por los sensibilizadores periféricos PGE2 y GDNF, de una manera dependiente de la activación opioide.

Materiales y 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 y sensibilizadores periféricos**

Los sensibilizadores periféricos, PGE2 y GDFN, se administraron de manera intraplantantar (i.pl.). La PGE2 (Tocris, Bristol, Reino Unido) y el GDNF (Preprotech, Londres, Reino Unido) se adminsitraron 10 y 20 minutos antes de la evaluación comportamental, respectivamente. Para estudiar el papel de los receptores sigma-1 en esta sensibilización periférica, como prototipos de antagonistas sigma-1, utilizamos el BD-1063 (Dihidrocloruro de 1-[2-(3,4-diclorofenil)etil]-4-metilpiperazina; Tocris) y el S1RA (Hidrocloruro de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)1H-pirazol-3-il] oxi] ethil] morfolina; DC Chemicals, Shanghai, China). Estos fármacos se administraron por vía subcutánea (s.c.) e i.pl. 30 min antes de la evaluación de la hiperalgesia, es decir, 20 min antes de la PGE2 y 10 min antes del GDNF. Para determinar la selectividad del efecto de los antagonistas sigma-1, se evaluó el efecto de su asociación con el agonista sigma-1 PRE-084 (Hidrocloruro de 2-[4-morfolinetil]1-fenilciclohexanocarboxilato; Tocris). Además, para determinar la participación de los opiodes endógenos en el efecto de los antagonistas sigma-1, se administró el antagonista opiode periférico naloxona metiodida (NxM) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), así como el antagonista selectivo μ ciprodime (CYP), el antagonista selectivo κ nor-binaltorpimina (n-BNI)

y el antagonista selectivo δ naltrindol (NTI) (Todos de Tocris). Todos estos fármacos se administraron de forma s.c. 5 min antes de los antagonistas sigma-1, es decir 35 min antes de la evaluación de la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2.

- **Evaluación de la hiperalgesia mecánica**

La hiperalgesia mecánica se evaluó mediante el test de presión de la pata (100 g), utilizando un Analgesímetro de presión (modelo 37215; Ugo-Basile, Varese, Italia). 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 mecánico, dejando un minuto entre medidas y se mide el tiempo de latencia hasta el forcejeo, según los procedimientos habituales en nuestro laboratorio [7,14,19].

- **Ensayos de inmunomarcaje**

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 (7). 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 EM-2 (como marcador de las neuronas C peptidérgicas y marcaje de este péptido opiode selectivo μ, respectivamente) e IB4 y EM-2 (como marcador de las neuronas C no peptidérgicas y marcaje de este péptido opiode selectivo μ, 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 (Sc-12498, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) en combinación con un anticuerpo de conejo anti-Endomorfina-2 (G-044-11, 10 ug/ml, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, Estados Unidos) o el anticuerpo de conejo anti-Endomorfina-2 solo (en el caso del marcaje EM-2 /IB4), 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-conejo Alexa Fluor-499 (A21206) con un anticuerpo de burro anti-cabra Alexa Fluor-594 (A11058) (1: 500 para ambos anticuerpos, Life Technologies, Alcobendas, España), en el caso del marcaje EM-2/TRPV1, o con la isolectina B4 (DL-1207, 1:100, Vector Laboratories, Peterborough, Reino Unido), en el caso del marcaje EM-2/IB4. 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

- **Efecto del antagonismo sigma-1 en la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2**

La administración i.pl. de PGE2 0,5 nmol disminuyó la latencia de respuesta frente al estímulo mecánico (100 g), indicando por tanto la aparición de hiperalgesia mecánica (Figura 1). Esta hiperalgesia mecánica fue revertida por la administración del antagonista sigma-1 S1RA de una manera dosis dependiente, administrado tanto de forma sistémica (32-64 mg/kg, s.c) como local (150-200 µg, i.pl.). De manera análoga, el antagonista sigma-1 BD-1063 revirtió la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2 administrado tanto de forma sistémica (8-32 mg/kg, s.c) como local (100-150 µg, i.pl.) (Figura 1).

Para determinar si ese efecto de los antagonistas sigma-1 era selectivo estudiamos el efecto del agonista sigma-1 PRE-084 (32 mg/kg, s.c.) en asociación con los antagonistas S1RA (64 mg/kg, s.c.) y BD-1063 (32 mg/kg, s.c), y los

resultados muestran que el efecto antihiperalgésico fue abolido por el agonista sigma-1 PRE-084 (Figura 2).

Por tanto, los antagonistas sigma-1 producen un efecto antihiperalgésico dosis dependiente y este es revertido por el agonista sigma-1 PRE-084.

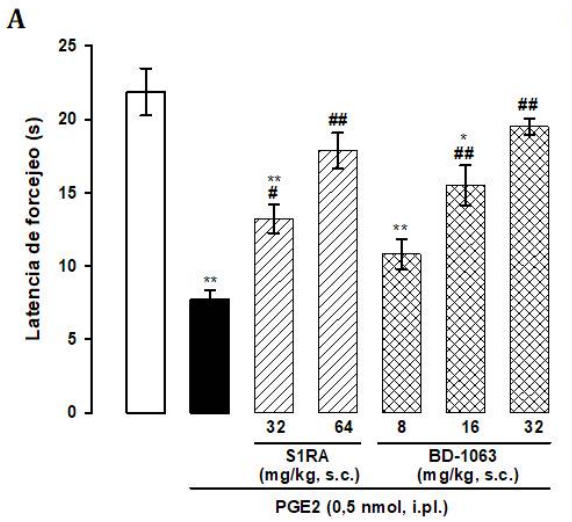


Fig 1. Efecto de la administración sistémica y local de los antagonistas sigma-1 en la hiperalgesia inducida por PGE2 frente a estímulos mecánicos. Los resultados muestran la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en la pata ipsilateral a la administración intraplantar (i.pl.) de PGE2 0,5 nmol o su solvente, y tratados por vía (A) subcutánea (s.c) con distintas dosis de S1RA (32 y 64 mg/kg), o con distintas dosis de BD-1063 (8, 16, 32 mg/kg), y (B) intraplantar (i.pl.) en la pata ipsilateral con distintas dosis de S1RA (150 y 200 µg), o con distintas dosis de BD-1063 (100 y 150 µg). Diferencias significativas entre los valores de los animales tratados con los solventes 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 S1RA o BD-1063 ##p<0,01 (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

- **Receptores opioides periféricos y antagonismo sigma-1 en la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2**

Para determinar si el efecto de los antagonistas sigma-1 en la hiperalgesia mecánica inducida por PGE2, depende de la participación de los opioides endógenos, se administró el antagonista opiode periférico naloxona metiodida (NxM, 1, 2 mg/kg, s.c.), así como el antagonista opioide selectivo µ ciprodime (CYP, 15 mg/kg, s.c.), el antagonista selectivo κ nor-binaltorpimina (n-NBI, 10 mg/kg, s.c.) y el antagonista selectivo δ naltrindol (NTI, 5 mg/kg, s.c.) en asociación con los antagonistas S1RA (64 mg/kg, s.c.) y BD-1063 (32 mg/kg, s.c). Se observó que el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1 fue abolido por la NxM (Figura 3 A), y, únicamente, por el antagonista selectivo µ CYP, pero ni el antagonista selectivo κ n-NBI ni el antagonista selectivo δ NTI revirtieron este efecto antihiperalgésico (Figura 3 B).

Estos resultados indican que el efecto de los antagonistas sigma-1 necesita de la activación de los receptores opioides μ periféricos.

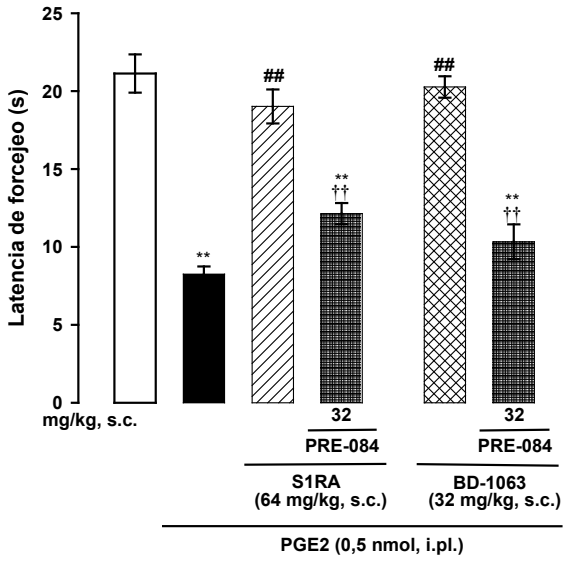


Fig 2. Efecto de la administración sistémica de los antagonistas sigma-1 tras la administración del agonista sigma-1 PRE-084 en la hiperalgesia inducida por PGE2 frente a estímulos mecánicos. Los resultados muestran la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en la pata ipsilateral a la administración intraplantar (i.pl.) de PGE2 0,5 nmol o su solvente, y tratados por vía subcutánea (s.c.) con S1RA (64 mg/kg) o BD-1063 (32 mg/kg) solos o en asociación a la administración previa de PRE-084 (32 mg/kg, s.c.). Diferencias significativas entre los valores de los animales tratados con los solventes y el resto de grupos experimentales: *p<0,05, **p<0,01; entre los animales tratados con PGE2 sola o en asociación con el S1RA o BD-1063 ##p<0,01; y entre los animales tratados con los antagonistas σ1 solos o en asociación con PRE: ††p<0.01 (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

- **Efecto del antagonismo sigma-1 en la hiperalgesia mecánica inducida por GDNF**

La administración i.pl. de GDNF (40 ng, i.pl.) disminuyó la latencia de respuesta frente al estímulo mecánico (100 g), indicando por tanto la aparición de hiperalgesia mecánica (Figura 4). Esta hiperalgesia mecánica no se vio alterada por la administración de los antagonistas sigma-1 S1RA (32-64 mg/kg, s.c.) y BD-1063 (32 mg/kg, s.c.) (Figura 4).

Por tanto, los antagonistas sigma-1 no producen un efecto antihiperalgésico en la hiperalgesia mecánica inducida por GDNF.

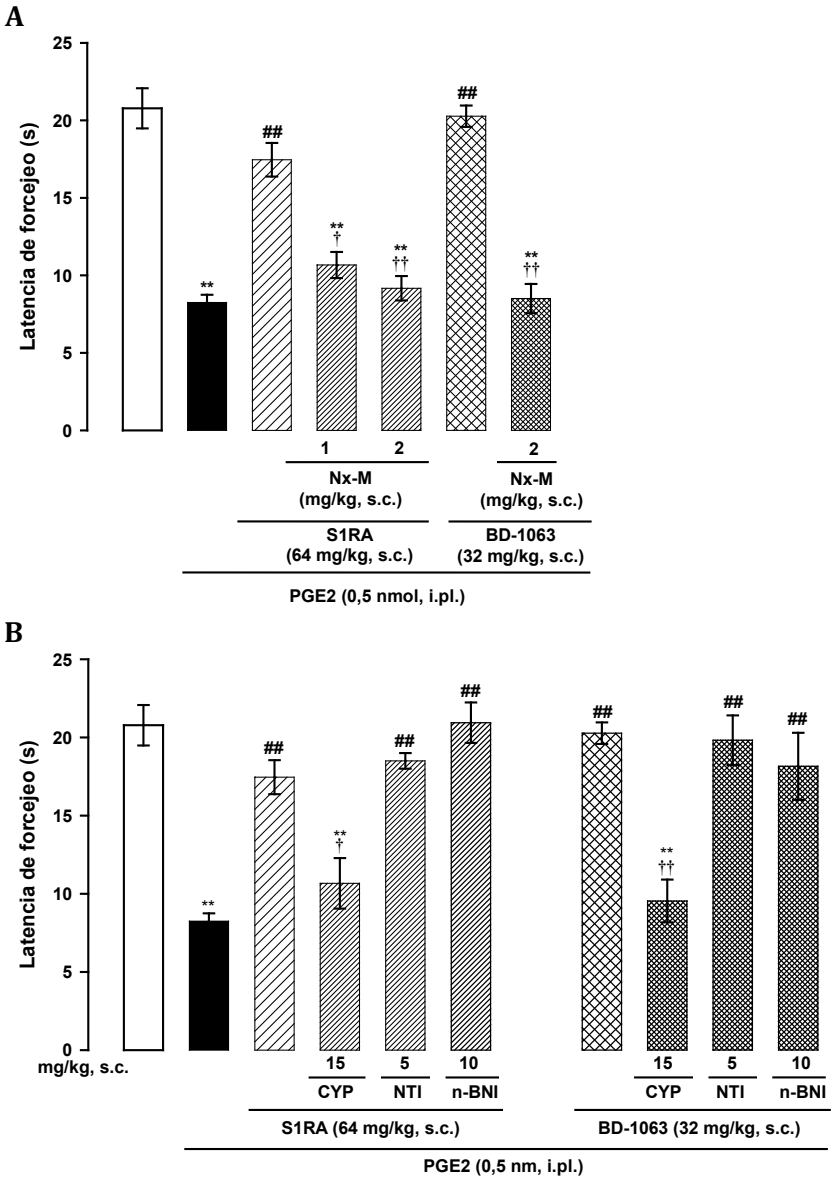


Fig 3. Efecto de la administración sistémica de los antagonistas sigma-1 tras la administración del antagonista opioide periférico NxM y de los antagonistas opiodes selectivos en la hiperalgesia inducida por PGE2 frente a estímulos mecánicos. Los resultados muestran la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en la pata ipsilateral a la administración intraplantar (i.pl.) de PGE2 0,5 nmol o su solvente, en animales tratados por vía subcutánea (s.c.) con S1RA (64 mg/kg) o BD-1063 (32 mg/kg) solos o asociados a (A) la administración previa de NxM (1-2 mg/kg, s.c.), y (B) la administración previa de los antagonistas opioides selectivos ciprodime (CYP, 15 mg/kg, s.c), o naltrindol (NTI, 5 mg/kg, s.c) o nor-binaltorpimina (n-BNI, 10 mg/kg, s.c). Diferencias significativas entre los valores de los animales tratados con los solventes y el resto de grupos experimentales: *p<0,05, **p<0,01; entre los animales tratados con PGE2 sola o en asociación con el S1RA o BD-1063 ##p<0,01; y entre los animales tratados con los antagonistas σ1 solos o con NxM o con los antagonistas opioides selectivos: ††p<0.01 (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

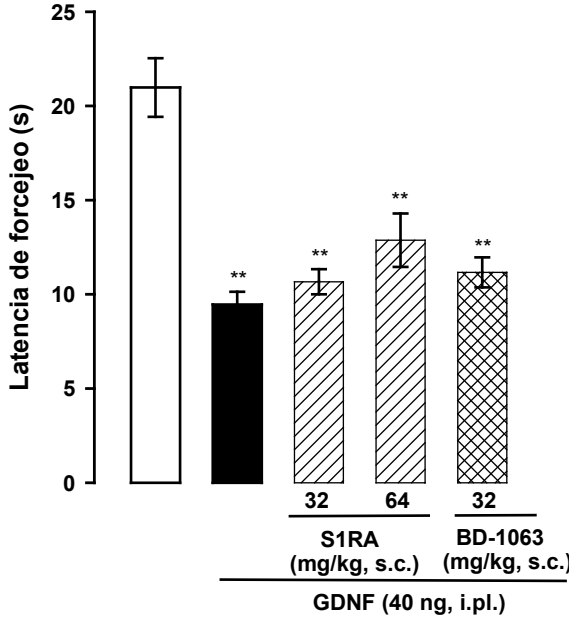


Fig 4. Efecto de la administración de los antagonistas sigma-1 en la hiperalgesia inducida por GDNF frente a estímulos mecánicos. Los resultados muestran la latencia de forcejeo al aplicar un estímulo mecánico de 100 g en la pata ipsilateral a la administración intraplantar (i.pl.) de GDNF 40 ng o su solvente, y tratados por vía subcutánea (s.c.) con distintas dosis de S1RA (32 y 64 mg/kg), o con BD-1063 (32 mg/kg). Diferencias significativas entre los valores de los animales tratados con los solventes y el resto de grupos experimentales: *p<0,05, **p<0,01 (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

- **Expresión de Endomorfina-2 en el DRG de ratón**

Para demostrar si el opioide endógeno con selectividad μ, que podría estar participando en las neuronas C peptidérgicas (TRPV1+) aunque no en las neuronas C no peptidérgicas (IB4+), era Endomorfina-2 (EM-2), realizamos el marcaje inmunohistoquímico de EM-2, tanto con TRPV1 como con IB4.

Se observó que la mayoría de las neuronas TRPV1+ expresaban EM-2, mientras que el marcaje de IB4 no colocalizaba con el de EM-2, mostrando un solapamiento casi inexistente. Por tanto la EM-2 se produce principalmente en las neuronas TRPV1+ y no en las IB4+ (Figura 5).

Estos resultados sugieren que las mismas neuronas sensibilizadas por PGE2 producen EM-2.

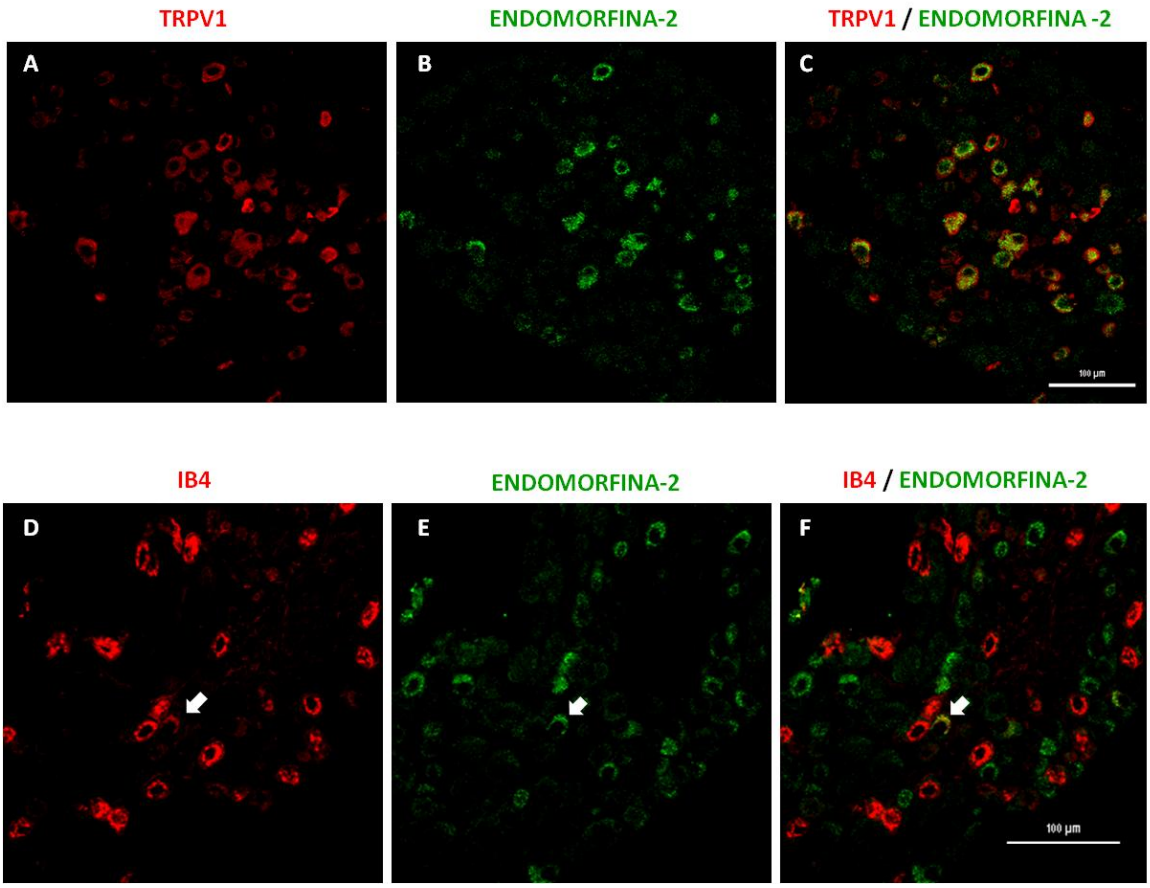


Fig 5. Inmunohistoquímica del ganglio de la raíz dorsal (DRG) L4. Marcaje de la subpoblación de neuronas TRPV1+ (A) y del opioide Endomorfina-2 (B), así como la combinación de las imágenes A y B (C). Y marcaje de la subpoblación de neuronas IB4+ (D) y del opioide Endomorfina-2 (E), así como la combinación de las imágenes D y E (F).

Discusión

En este estudio mostramos que la PGE2 y el GDNF inducen hiperalgesia mecánica, pero únicamente en el caso de la PGE2 es revertida por los antagonistas sigma-1, y esto depende de la activación opioide.

El receptor sigma-1 modula la analgesia de fármacos opioides de todos los subtipos (μ, δ, κ) en el dolor nociceptivo (14, 15). Esta modulación opioide por el receptor sigma-1 tiene un papel fisiopatológico en la inflamación, ya que el antagonismo sigma-1 abole la hiperalgesia inflamatoria inducida por carragenina (tres horas después de su administración) (19), y el mecanismo de este efecto antihiperalgésico consiste en la potenciación de la analgesia opioide periférica inducida por POEs de origen inmunitario, aunque no se ha explorado el o los subtipos de receptores opioides involucrados (20).

En este estudio mostramos que el antagonismo sigma-1 revierte la hiperalgesia inducida por PGE2. Cabe destacar que las dosis utilizadas, tanto de PGE2 (25),

como de los antagonistas sigma-1 (19, 20) son similares a las dosis usadas en estudios previos. Además, el efecto de los antagonistas sigma-1 revirtió por el antagonista opioide periférico NxM, administrado a una dosis utilizada en estudios previos (2 mg/kg) para discriminar la analgesia opioide a nivel periférico de la central (7). Por lo tanto el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1 depende de la activación de los receptores opioides periféricos.

La PGE2 es un algógeno químico liberado durante el proceso inflamatorio, y producen un efecto rápido, mucho más rápido que la carragenina, y no requiere de la presencia de células inmunitarias, sino que es una sensibilización directa neuronal (1,4). Por tanto, el efecto opioide periférico de los antagonistas sigma-1 en la hiperalgesia inducida por PGE2 debe depender de la producción de POEs periféricos de un origen diferente al de células inmunitarias.

Además, demostramos que el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1 depende exclusivamente de la activación de receptores opiodies del subtipo μ (sensibles al antagonismo con cyprodime). Por lo tanto, el POE involucrado en el efecto sigma-1 debe tener selectividad por este subtipo de receptor opioide. Las endomorfinas son los POEs con mayor selectividad μ. Hasta donde nuestro conocimiento abarca, sólo la presencia de EM-2 (y no de EM-1) ha sido descrita con anterioridad en tejido periférico. De hecho, se ha mostrado que la EM-2 colocaliza con las neuronas CGRP+ en el DRG de rata, lo que podría indicar que este péptido opioide tiene una expresión en nociceptores peptidérgicos (23, 24). Sin embargo, en la rata las poblaciones de neuronas C tienen un alto grado de solapamiento (8), por lo que es complicado llegar a esta conclusión. En el ratón las poblaciones de neuronas C pueden diferenciarse claramente mediante su marcaje con TRPV1+ (peptidérgicas) e IB4+ (no peptidérgicas). En nuestro estudio hemos demostrado que los nociceptores TRPV1+ son capaces de producir EM-2.

El TRPV1 es un canal de Ca2+, y su activación produce un incremento de la concentración intracelular de este ion (1, 26). Se ha descrito que la EM-2 es liberada por las neuronas del DRG en respuesta a incrementos de Ca^{2+} (24), por lo que la activación TRPV1 podría promover la liberación de EM-2 en nociceptores peptidérgicos sensibilizados. La PGE2 es capaz de sensibilizar a las neuronas TRPV1+ por acción de la actividad PKA y la consecuente fosforilación de este receptor (1, 4), por lo que podría desencadenar este proceso de liberación de EM-

2. Es interesante mencionar que la activación de los receptores μ tiene un mecanismo de señalización contrapuesto a la sensibilización TRPV1 por PKA, puesto que los agonistas μ activan a proteínas Gi/o que disminuyen la actividad PKA por diminución de la actividad adenilato ciclasa (27). Sin embargo, pese a que la PGE2 podría estar simultáneamente sensibilizando al TRPV1 y promoviendo la liberación de EM-2, el resultado neto de ambos procesos es la producción de hiperalgesia, y no de analgesia opioide resultado de la liberación de este POE. Hemos descrito que los receptores sigma-1 son un freno biológico a la analgesia opioide periférica (7, 14, 20), por lo que la activación tónica del receptor sigma-1 podría estar disminuyendo la acción de la EM-2 en estas neuronas favoreciendo la sensibilización de estas, y el bloqueo del receptor sigma-1 podría maximizar el efecto de la EM-2 disminuyendo la sensibilización inducida por PGE2. Esta hipótesis se resume en la Figura 6A.

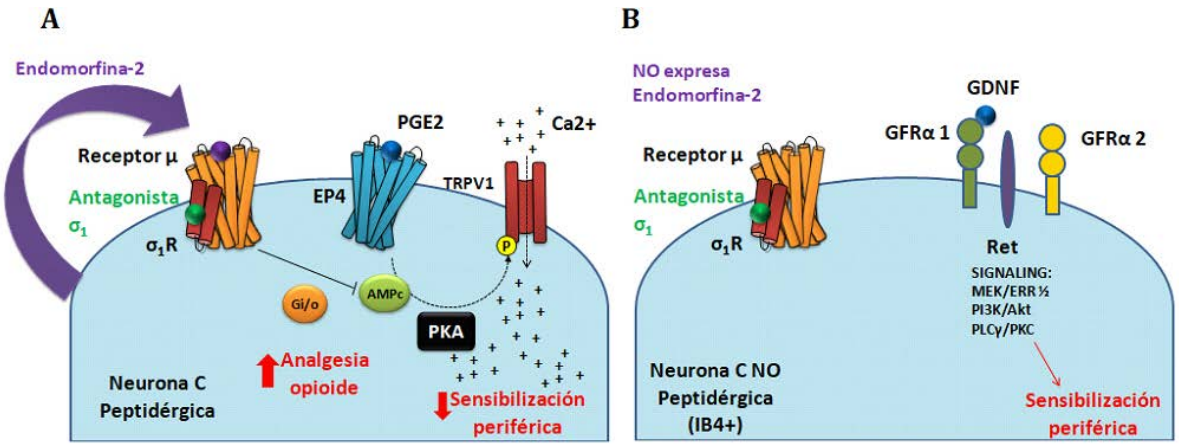


Fig 6. Representación esquemática de la hipótesis del mecanismo de acción de los antagonistas sigma-1 en la hiperalgesia inducida por PGE2 y GDNF. Según los resultados obtenidos hasta ahora lo que podría estar ocurriendo en las neuronas C peptidérgicas (A) sería que la PGE2 activa a TRPV1 aumentando el calcio intracelular lo que produce una sensibilización periférica y las mismas neuronas C peptidérgicas sensibilizadas liberan endomorfina-2, sin embargo el receptor sigma-1 estaría bloqueando su receptor μ, pero al unirse un antagonista sigma-1 se potencia la señalización μ y por tanto la analgesia opioide. Por otro lado, en las neuronas C no peptidérgicas (B) el GDNF se uniría a sus receptores desencadenando una sensibilización periférica, pero estas neuronas no expresan endomorfina-2 por tanto se mantendría la sensibilización periférica.

A pesar del efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1 en la hiperalgesia inducida por PGE2, estos compuestos administrados a dosis activas en la hiperalgesia inducida por este sensibilizador periférico, carecieron de actividad en la hiperalgesia inducida por GDNF. Este último es también un sensibilizador periférico producido durante el proceso inflamatorio, con acción directa neuronal, aunque por mecanismos diferentes a los de PGE2. De hecho, el GDNF sensibiliza a

las neuronas C no peptidérgicas (IB4+) (5,28). El receptor sigma-1 se expresa en todas las neuronas sensoriales periféricas (7) y potencialmente podría jugar un papel tanto en la sensibilización de las neuronas C peptidérgicas por PGE2 como en la sensibilización de las neuronas C no peptidérgicas por el GDNF. De hecho, un estudio reciente de nuestro grupo de investigación ha mostrado que las neuronas C no peptidérgicas expresan niveles considerablemente mayores de receptores sigma-1 que las neuronas TRPV1+)(7). Sin embargo, en este estudio mostramos que las neuronas C no peptidérgicas carecen virtualmente de expresión de EM-2, por lo que pese a sus altos niveles de receptor sigma-1, los antagonistas de este receptor son incapaces de producir su efecto antihiperalgésico dependientes de la activación opioide μ. Esto se resume en la Figura 6B.

Un estudio de otro grupo de investigación realizado en rata, ha mostrado que la administración local del agonista sigma-1 selectivo PRE-084 promueve la alodinia mecánica inducida por α,β-metilén-ATP, un análogo del ATP que activa los receptores P2X3 (29). Pese a que los receptores P2X3 se expresan a altos niveles en neuronas IB4+, esta población neuronal se solapa en gran medida con las neuronas TRPV1+ en esta especie animal, como se ha comentado anteriormente (7). Esto podría explicar la acción del receptor sigma-1 en la rata mientras que en nuestro estudio en ratón parecen ser inactivos en las neuronas IB4+ sensibilizadas.

Por último es interesante mencionar la aplicabilidad de los antagonistas sigma-1 como alternativa a los antagonistas TRPV1, modulando a estas neuronas de manera indirecta. Estos antagonistas TRPV1 han sido ampliamente estudiados en diferentes tipos de dolor, como en artrosis y en dolor canceroso, entre otros (6,30,31). Sin embargo, los antagonistas TRPV1 producen muchos efectos secundarios, como fiebre o alteraciones del umbral térmico nociceptivo, entre otros (32). A diferencia de esto, los antagonistas sigma-1 no producen efecto alguno *per se* en dolor nociceptivo térmico (7), y de hecho el antagonista sigma-1 S1RA ha sido probado en humanos y muestra un perfil de seguridad muy prometedor (16,33). Por lo tanto, los antagonistas de este receptor, que actúan únicamente en la neuronas sensibilizadas, podrían ofrecer una alternativa con un perfil de seguridad mejorado sobre los antagonistas TRPV1.

En conclusión, nuestros datos indican que el antagonismo sigma-1 podría disminuir la hiperalgesia mecánica inducida por la PGE2 a través de la modulación

del efecto de la EM-2 en las aferentes primarias TRPV1+, mientras que no altera la sensibilización de los nociceptores C no peptidérgicos por el GDNF.

Agradecimientos

MINECO (SAF2013-47481P y SAF2016-80540R), Junta de Andalucía (grupo CTS 109), fondos FEDER.

Bibliografía

1. Bhave G, Gereau RW. (2004). Posttranslational mechanisms of peripheral sensitization. J Neurobiol. 61(1), 88-106.

2. Scholz J, Woolf CJ. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. Nat Neurosci. 10(11), 1361-8.

3. 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. 19(2), 227-43.

4. Cheng JK, Ji RR. (2008). Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. Neurochem Res. 33(10), 1970-8.

5. Woolf CJ, Ma Q. (2007). Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. Neuron. 55(3), 353-64.

6. 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.

7. Montilla-García Á, Perazzoli G, Tejada MÁ, González-Cano R, Sánchez-Fernández C, Cobos EJ, Baeyens JM. (2018). Modality-specific peripheral antinociceptive effects of μ-opioid agonists on heat and mechanical stimuli: Contribution of sigma-1 receptors. Neuropharm. 24(135), 328-342.

8. Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR, Davis BM. (2004). Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. J Neurosci. 24(28):6410-5.

9. Cavanaugh DJ, Lee H, Lo L, Shields SD, Zylka MJ, Basbaum AI, Anderson DJ. (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(22), 9075-80.

10. Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI. (2009). Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. Cell. 137(6), 1148-59.

11. Chu KL, Chandran P, Joshi SK, Jarvis MF, Kym PR, McGaraughty S. (2011).TRPV1-related modulation of spinal neuronal activity and behavior in a rat model of osteoarthritic pain. Brain Res. 1369, 158-66.

12. Maqboul A, Elsadek B. (2018). Expression profiles of TRPV1, TRPV4, TLR4 and ERK1/2 in the dorsal root ganglionic neurons of a cancer-induced neuropathy rat model. PeerJ. 6, e4622.

13. Ruiz-Cantero MC, Montilla-García Á, Perazzoli G, Sánchez-Fernández C, Baeyens JM, Cobos EJ. (2017). Papel de las neuronas TRPV1+ en el dolor nociceptivo y en la hiperalgesia inducida por prostaglandina E2. Encuentros en Neurociencias (vol. IV). Granada, pp. 31-52.

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 μ-opioid analgesia by σ1 receptors. J Pharmacol Exp Ther. 348(1), 32-45.

15. Sánchez-Fernández C, Entrena JM, Baeyens JM, Cobos EJ. (2017). Sigma-1 Receptor Antagonists: A New Class of Neuromodulatory Analgesics. Adv Exp Med Biol. 964, 109-132.

16. Bruna J, Videla S, Argyriou AA, Velasco R, Villoria J, Santos C, Nadal C, Cavaletti G, Alberti P, Briani C, Kalofonos HP, Cortinovis D, Sust M, Vaque A, Klein T, Plata-Salaman C. (2018). Efficacy of a novel sigma-1 receptor antagonist for oxaliplatin-induced neuropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIa clinical trial. Neurotherapeutics. 15(1), 178-189.

17. Nieto FR, Cendán CM, Sánchez-Fernández C, Cobos EJ, Entrena JM, Tejada MA, Zamanillo D, Vela JM, Baeyens JM. (2012). Role of sigma-1 receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. J Pain. 13(11), 1107-21.

18. Sánchez-Fernández C, Nieto FR, González-Cano R, Artacho-Cordón A, Romero L, Montilla-García Á, Zamanillo D, Baeyens JM, Entrena JM, Cobos EJ. (2013). Potentiation of morphine-induced mechanical antinociception by σ_1 receptor inhibition: role of peripheral σ_1 receptors. Neuropharmacology. 70, 348-58.

19. Tejada MÁ, 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.

20. Tejada MÁ, Montilla-García A, Cronin SJ, Cikes D, Sánchez-Fernández C, González-Cano R, Ruiz-Cantero MC, Penninger JM, Vela JM, Baeyens JM, Cobos EJ. (2017). Sigma-1 receptors control immune-driven peripheral opioid analgesia during inflammation in mice. Proc Natl Acad Sci. USA. 114(31), 8396-8401.

21. Tejada MÁ, Montilla-García Á, González-Cano R, Bravo-Caparrós I, Ruiz-Cantero MC, Nieto FR, Cobos EJ. (2018). Targeting immune-driven opioid analgesia by sigma-1 receptors: Opening the door to novel perspectives for the analgesic use of sigma-1 antagonists. Pharmacol Res. 131, 224-230.

22. Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. Nature. 386(6624), 499-502.

23. Sanderson Nydahl K, Skinner K, Julius D, Basbaum AI. (2004) Co-localization of endomorphin-2 and substance P in primary afferent nociceptors and effects of injury: a light and electron microscopic study in the rat. Eur J Neurosci. 19(7), 1789-99.

24. Scanlin HL, Carroll EA, Jenkins VK, Balkowiec A. (2008). Endomorphin-2 is released from newborn rat primary sensory neurons in a frequency- and calcium-dependent manner. Eur J Neurosci. 27(10), 2629-42.

25. Claudino RF, Kassuya CA, Ferreira J, Calixto JB. (2006).Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E2-induced mouse paw edema. J Pharmacol Exp Ther. 318(2), 611-8.

26. Nicol GD, Klingberg DK, Vasko MR. (1992). Prostaglandin E2 increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. J Neurosci. 12(5), 1917-27.

27. Vetter I, Wyse BD, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ, Cabot PJ. (2006). The mu opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. Mol Pain. 2, 22.

28. Bogen O, Joseph EK, Chen X, Levine JD. (2008).GDNF hyperalgesia is mediated by PLCgamma, MAPK/ERK, PI3K, CDK5 and Src family kinase signaling and dependent on the IB4-binding protein versican. Eur J Neurosci. 28(1), 12-9.

29. Kwon SG, Roh DH, Yoon SY, Choi SR, Choi HS, Moon JY, Kang SY, Kim HW, Han HJ, Beitz AJ, Oh SB, Lee JH. (2016) Role of peripheral sigma-1 receptors in ischaemic pain: Potential interactions with ASIC and P2X receptors. Eur J Pain. 20(4), 594-606.

30. Chu KL, Chandran P, Joshi SK, Jarvis MF, Kym PR, McGaraughty S. (2011).TRPV1-related modulation of spinal neuronal activity and behavior in a rat model of osteoarthritic pain. Brain Res. 1369, 158-66.

31. Maqboul A, Elsadek B. (2018). Expression profiles of TRPV1, TRPV4, TLR4 and ERK1/2 in the dorsal root ganglionic neurons of a cancer-induced neuropathy rat model. PeerJ. 6, e4622.

32. Gavva NR. (2008). Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. Trends Pharmacol Sci. 29(11), 550-7.

33. Díaz JL, Cuberes R, Berrocal J, Contijoch M, Christmann U, Fernández A, Port A, Holenz J, Buschmann H, Laggner C, Serafini MT, Burgueño J, Zamanillo D, Merlos M, Vela JM, Almansa C. (2012). Synthesis and biological evaluation of the 1-arylpyrazole class of σ1 receptor antagonists: identification of 4-{2-[5-Methyl-1-(naphthalen-2-yl)-1H-pyrazol-3-yloxy]ethyl}morpholine (S1RA, E-52862). J Med Chem. 55(19), 8211-24.

Capítulo 11

El antagonismo farmacológico del receptor sigma-1 reduce el dolor neuropático inducido por la lesión parcial del nervio ciático

Bravo-Caparrós I, Nieto FR, Perazzoli G, Baeyens JM, Cobos EJ

Resumen

Introducción: Las terapias actuales frente al dolor neuropático tienen una eficacia limitada, por lo que la búsqueda de nuevos fármacos antineuropáticos resulta de vital importancia. Los antagonistas del receptor σ_1 disminuyen la hipersensibilidad sensorial producida por la compresión de un nervio periférico, aunque no se conoce si son eficaces en neuropatías producidas por sección nerviosa. El "Spared Nerve Injury" (SNI) consiste en seccionar las ramas peroneo común y tibial del nervio ciático, dejando la rama sural intacta. Como consecuencia al daño nervioso, se desarrolla una marcada hipersensibilidad sensorial en el territorio inervado por el sural.

Objetivos: Evaluar el desarrollo de la hipersensibilidad sensorial frente a diferentes estímulos tras el SNI, y estudiar desde un punto de vista comportamental el papel del receptor σ_1 en este proceso.

Material y métodos: Los experimentos se realizaron en ratones CD1 hembras. Se evaluaron las repuestas del animal tras la estimulación del territorio sural de la planta de la pata con: filamentos de von Frey (alodinia mecánica); una gota de acetona (alodinia al frio), y un haz de luz calorífico (hiperalgesia térmica). El antagonista σ_1 S1RA y el agonista σ_1 PRE-084 fueron administrados por vía subcutánea.

Resultados: Los ratones mostraron una acusada alodinia mecánica y al frio así como hiperalgesia térmica al calor. De manera similar, la administración del S1RA atenuó la alodinia mecánica neuropática y abolió la alodinia al frio y la hiperalgesia

térmica. Estos efectos del S1RA fueron revertidos por la administración de PRE-084, indicando que son mediados por el antagonismo del receptor σ_1.

Conclusión: Los receptores σ_1 juegan un papel relevante en las alteraciones sensoriales que se desarrollan tras el SNI. El antagonismo farmacológico de este receptor podría ser útil para la prevención y/o el tratamiento del dolor neuropático que se desarrolla tras la sección de un nervio.

Introducción

El Dolor Neuropático es un dolor crónico que se produce por un daño o enfermedad que afecta el sistema somatosensorial (1). Se estima que la prevalencia del dolor neuropático en la población en general es del 6.9-10% (2) y se espera que se incremente en un futuro por el aumento de la esperanza de vida, así como por el aumento de la supervivencia de enfermos con cáncer tras el tratamiento con antineoplásicos, entre otras causas (1). El dolor neuropático afecta drásticamente a la calidad de vida de los pacientes que lo sufren. Sin embargo, a pesar de los enormes esfuerzos a nivel preclínico y clínico, no se disponen de tratamientos eficaces para aminorar o prevenir los síntomas del dolor neuropático y por ello sigue siendo un problema sociosantario muy importante sin solución hasta el momento (3).

El receptor sigma-1 (σ_1) es una proteína chaperona mediada por ligando altamente expresada en diferentes zonas claves el sistema nervioso para controlar el dolor, tanto en el sistema nervioso central como periférico, donde interactúa y modula diferentes receptores y canales iónicos (4). El papel del receptor σ_1 en diferentes tipos de dolor ha sido ampliamente estudiado y se conoce que participa en el dolor inducido por formalina (5, 6, 7), en la hiperalgesia inflamatoria (8, 9, 10) y en la hipersensibilidad mecánica inducida por capsaicina (11, 12), ya que todas estas respuestas están reducidas en ratones knockout para el receptor σ_1 (σ_1-KO) y/o en ratones salvajes (WT) tratados con antagonistas de dicho receptor. En esta misma línea, se ha descrito que los receptores σ_1 juegan un papel importante en el dolor neuropático de diversa etiología, pues está reducido tanto en animales σ_1-KO (13, 14, 15) como en animales WT tratados con antagonistas σ_1 (14, 16, 17).

Aunque el papel de la inhibición del receptor σ_1 en modelos preclínicos de dolor neuropático inducidos por lesión de nervios periféricos ha sido descrita,

estos estudios se limitan a modelos con constricción o ligadura del nervio ciático (13, 18). Sin embargo, los patrones de comportamiento (19), los cambios neuroplásticos (19) y los cambios en los perfiles génicos (20, 21), difieren entre modelos de denervación y modelos de constricción o ligadura del nervio ciático, sugiriendo que la respuesta al tratamiento farmacológico podría ser diferente también.

Numerosas intervenciones quirúrgicas precisan del corte de nervios y como consecuencia de ello los pacientes pueden sufrir dolor neuropático (22). El papel de los receptores σ_1 en un modelo de dolor neuropático inducido por transección de nervios no ha sido estudiado hasta el momento. Por consiguiente, el objetivo de este estudio es examinar si el bloqueo de los receptores σ_1 con el antagonista σ_1 selectivo S1RA (actualmente bajo desarrollo clínico para el tratamiento del dolor neuropático (23, 24)) alivia la hipersensibilidad dolorosa asociada a un modelo de denervación parcial del nervio ciático, el modelo de "Spared Nerve Injury" (SNI de sus siglas en inglés) en ratón.

Material y métodos

- **Animales**

Los experimentos se realizaron en ratones hembra CD1 (Charles River, Barcelona, España) de 26-32 g. Los animales fueron alojados en cajas con libre acceso a comida y agua antes de los experimentos. Fueron mantenidos en un animalario con la temperatura y la luz controlada (22 ± 2 ºC, y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas). Todos los experimentos fueron realizados durante la fase de luz (de 9:00 a 15:00) y realizados de acuerdo con la normativa institucional (Comité de ética en investigación animal de la Universidad de Granada, España) e internacional (Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo).

- **Modelo de sección de nervio (Spared Nerve Injury, SNI)**

El SNI se realizó como se describió previamente (25). Brevemente, se anestesia al animal con isoflurano (2%) y se realiza una incisión en la piel a la altura de la cadera. A continuación, se separaran las fascias musculares hasta tener acceso al nervio ciático con sus tres ramas (sural, peroneal común y tibial), y se ligan con hilo de sutura y seccionan las ramas peroneal común y tibial, dejando la rama sural intacta. En los animales controles llamados “sham” el nervio ciático fue expuesto

pero no se seccionó ni se llevó a cabo ningún tipo de manipulación. Finalmente, la piel se cierra con grapas quirúrgicas.

- **Fármacos y administración**

Para los estudios comportamentales usamos dos ligandos selectivos del receptor sigma-1: el antagonista σ_1 (E-52862.HCl; 4-(2-((5-methyl-1-(2-naphthalenyl)-1H-pyrazol-3-yl)oxy)ethyl) morpholine) (8-128 mg/kg; DC Chemicals, Shanghai, China), y el agonista σ_1 PRE-084 (2-(4-morpholinethyl)1-phenylcyclohexanecarboxylate hydrochloride) (32 mg/kg; Tocris Cookson Ltd., Bristol, Reino Unido) (16, 26). Los fármacos fueron disueltos en suero salino fisiológico estéril hasta la dilución final justo antes de su administración, y fueron administrados subcutáneamente (s.c.) en la zona interescapular en un volumen de inyección de 5 ml/kg. Los animales controles recibieron el mismo volumen del solvente de los fármacos (salino) s.c.. Cuando se estudió el efecto de la asociación de dos fármacos (S1RA Y PRE-084), estos fueron administrados en diferentes localizaciones de la zona interescapular.

- **Estudios comportamentales**

Para estudiar el efecto del S1RA en la hipersensibilidad dolorosa producida por el SNI, se evaluaron las respuestas basales antes de la realización de la cirugía. A continuación se llevó a cabo la cirugía y 7 días después del SNI, tras comprobar que la hipersensibilidad estaba desarrollada (tiempo 0), se administró el S1RA o salino s.c., y las respuestas de los animales a los diferentes test nociceptivos fueron medidas 30, 90 y 180 minutos tras la administración. En los experimentos de asociación de ambos ligandos σ_1, el agonista PRE-084 o su solvente fueron administrados s.c. 5 minutos antes de la administración de S1RA.

En todos los casos, cada ratón fue evaluado en un solo test nociceptivo y recibió la administración de los fármacos una sola vez. Todas las evaluaciones comportamentales fueron realizadas por un observador que desconocía el tratamiento que habían recibido previamente los animales.

1- Procedimiento para medir la alodinia mecánica

La alodinia mecánica fue medida utilizando los filamentos de von Frey con el método up-down, como fue previamente descrito (27). Cada día de evaluación, los ratones fueron habituados durante 120 minutos en unas cajas individuales de

plástico trasparentes (7 x 7 x 13 cm) situadas encima de una plataforma de malla metálica. Tras el periodo de habituación, los filamentos fueron aplicados en el territorio sural de la planta de la pata trasera del lado lesionado (ipsilateral), presionando hasta producir una ligera curvatura del filamento y retirando el filamento a los 2-3 segundos lentamente. Los monofilamentos calibrados de von Frey (Stoelting, Wood Dale, USA) con un rango de fuerza de 0.02 a 1.4 g, fueron aplicados usando el método up-down, empezando por el filamento de 0.6 g y dejado un tiempo de 10 segundos entre sucesivas medidas. La respuesta se consideró positiva cuando el animal retira bruscamente la pata o bien cuando se muerde o lame la pata, o realiza un pataleo, inmediatamente después de la estimulación plantar. En cada aplicación consecutiva, si no hay respuesta se empleaba un filamento de mayor fuerza; por el contrario, si la respuesta era positiva, se aplicaba un filamento con una fuerza menor.

2- Procedimiento para medir la alodinia al frío

La alodinia al frio fue evaluada como describió Nieto et al. (28), aplicando una gota de acetona en la pata trasera del animal y midiendo el tiempo de lamido/mordisqueo de la pata. Cada día de evaluación, los ratones fueron habituados durante 30 minutos en unos habitáculos individuales de plástico trasparentes (7 x 7x 13 cm) situados encima de una plataforma de malla metálica. La acetona fue aplicada 3 veces en la planta de la pata trasera ipsilateral en intervalos de 30 segundos y la duración del lamido o mordisqueo de la pata fue cuantificado mediante un cronómetro y representado como tiempo acumulado de lamido/mordisqueo de la pata de las 3 medidas. El tiempo de corte utilizado fue de 10 segundos en cada una de las 3 medidas, dado que los animales raramente se lamen la pata durante más de 10 segundos.

3- Procedimiento para medir la hiperalgesia al calor

La hiperalgesia al calor fue evaluada con el método de Hargreaves con ligeras modificaciones (8). Los ratones fueron habituados durante 2 horas en habitáculos de plástico individuales (9 x 9 x 22 cm) situados encima de un cristal temperado a 30 °C. Tras la habituación, se aplicó un haz de luz que produce calor hacia la planta de la pata trasera ipsilateral del animal, registrándose el tiempo transcurrido hasta que el animal retiraba la pata. Cada animal fue evaluado 3 veces y las

latencias fueron la media para cada animal. Se dejaron al menos 60 segundos entre sucesivas medidas. La latencia de corte fue de 20 segundos en cada medida para evitar lesiones en la piel y un sufrimiento innecesario a los animales.

- **Análisis estadístico**

Las diferencias entre los valores fueron analizadas usando un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías de medidas repetidas seguida del test de Bonferroni, mediante el programa SigmaPlot 12.0 (Systat Sofware Inc, USA). Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando los valores de P fueron inferiores a 0.05.

Resultados

- **Manifestaciones comportamentales indicativas de dolor neuropático inducidas por el SNI en ratones**

Los animales controles (Sham) no modificaron significativamente las respuestas tras la cirugía en los tres test comportamentales estudiados (Figuras 1A-C). Sin embargo, después del SNI, los animales desarrollaron alodinia mecánica, ya que se produjo una reducción significativa del umbral mecánico, que fue detectable a partir del día 3 después de la cirugía, alcanzando su máxima reducción el día 7 y manteniéndose durante los 21 días de evaluación. Además los ratones también desarrollaron una marcada alodinia al frio, pues se incrementó el tiempo de lamido/mordisqueo de la pata tras la aplicación de acetona, a partir del día 3, manteniéndose significativamente elevado durante los 21 días de estudio, en comparación con el grupo sham (Figura 1B). Igualmente, los ratones desarrollaron hiperalgesia al calor en el test de Hargreaves tras el SNI, con una reducción de la latencia de retirada de la pata tras la estimulación térmica significativamente más baja que el grupo sham en todos los tiempos evaluados tras el SNI (Figura 1C).

En resumen, el SNI induce alodinia mecánica y al frio así como hiperalgesia térmica en ratones, mientras que los animales controles sham no mostraron ningún comportamiento indicativo de dolor.

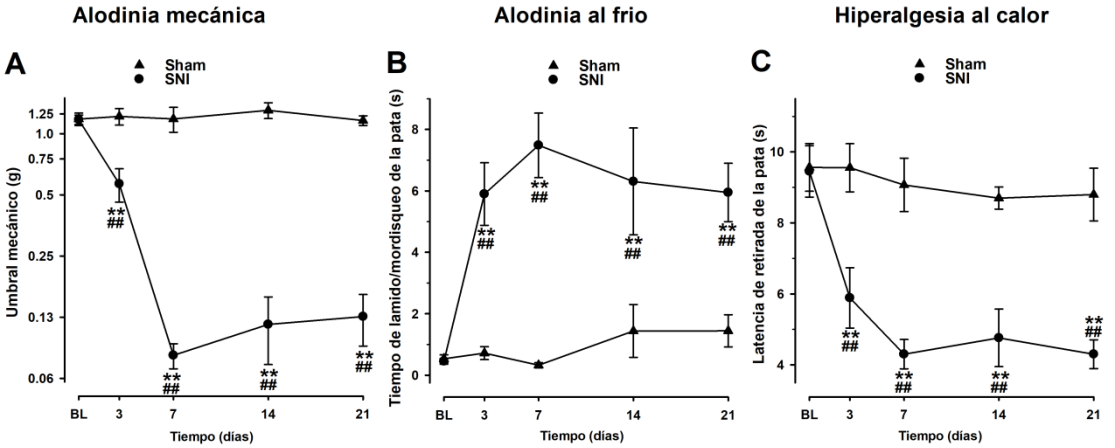


Fig. 1. El modelo de lesión mecánica del nervio ciático, Spared nerve injury (SNI), produce en ratones: alodinia mecánica (A), alodinia al frio (B) e hiperalgesia al calor (C). El umbral de fuerza necesario para retirar la pata en el test de von Frey (A), la duración del tiempo de lamido/mordisqueo de la pata en el test de la acetona (B), y la latencia de retirada de la pata en el test de Hargreaves (C) fueron medidos el día antes de la cirugía (medida basal, BL), y en los días 3, 7, 14 y 21 después de la cirugía en la pata ipsilateral. Cada punto y líneas verticales representa la media ± SEM de los valores obtenidos en 10-12 animales. Diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los grupos Sham y SNI en el mismo día: #P < 0.05; ##P < 0.01; y entre los valores antes de la cirugía y los días después del SNI: * P < 0.05; ** P < 0.01 (ANOVA de doble vía de medidas repetidas seguido del test de Bonferroni)

- **Efecto de la administración sistémica del antagonista selectivo del receptor σ_1 S1RA en la alodinia mecánica y al frio e hiperalgesia térmica inducidas por el SNI**

Para estudiar los efectos del antagonismo farmacológico del receptor σ_1 en el dolor neuropático inducido por el SNI, el antagonista selectivo del receptor σ_1, S1RA, fue administrado subcutaneamente (s.c.) después de que la neuropatía estuviese totalmente establecida (siete días tras la cirugía). En todos los grupos el umbral de fuerza necesario para producir una retirada de la pata antes del tratamiento con S1RA o salino (tiempo 0) fue significativamente más bajo que los valores previos a la cirugía (BL) (Figura 2A, tiempo 0 versus BL), lo cual indica que los animales han desarrollado hipersensibilidad (alodinia) mecánica tras el SNI. En estos ratones, la administración de salino no modificó significativamente la alodinia mecánica inducida por el SNI durante el periodo de evaluación de 3 horas tras su administración (Figura 2A). Por el contrario, la administración aguda de S1RA (32-128 mg/kg; s.c.) atenuó la alodinia mecánica en comparación con el salino, de forma dosis dependiente (Figura 2A). En el test de la acetona, en todos los grupos de animales, 7 días tras el SNI, la duración del tiempo de lamido/mordisqueo producida por la acetona antes de administrar salino o S1RA

(tiempo 0) fue significativamente mayor que sus valores basales antes de la cirugía (BL), lo que indica que el desarrollo de alodinia al frio tras el SNI (Figura 2B, tiempo 0 versus BL). En estos ratones, la administración aguda de salino no modificó la respuesta a la acetona en ningún punto temporal evaluado (Figura 2B). Sin embargo, la administración aguda de S1RA (8-64 mg/kg; s.c.) redujo dosis dependientemente la duración del tiempo de lamido/mordisqueo de la pata producido por la acetona a los 30 y 90 minutos tras su administración (Figura 2B). Finalmente, 7 días tras el SNI, antes de administrar el S1RA o su vehículo, la latencia de retirada de la pata en el plantar test fue significativamente menor que los valores basales registrados (BL), en todos los grupos de animales, lo que muestra el desarrollo de hiperalgesia térmica (Figura 2C, tiempo 0 versus BL). En estos animales, la administración de salino no modificó la hiperalgesia térmica producida por el SNI, mientras que la administración de S1RA (32-64 mg/kg; s.c.) inhibió esta respuesta dosis dependientemente (Figura 2C).

Basándonos en estos resultados, concluimos que la administración sistémica aguda del antagonista del receptor σ_1, S1RA, revierte la hipersensibilidad al frio y al calor dosis de forma dosis dependiente y reduce parcialmente la alodinia mecánica inducida por el SNI.

- **Efecto de la co-administración sistémica del agonista selectivo del receptor σ_1 PRE-084 y del antagonista selectivo del receptor σ_1 S1RA, en la alodinia mecánica y al frio e hiperalgesia térmica inducidas por el SNI**

En contra del efecto del antagonista del receptor σ_1 S1RA, el agonista selectivo σ_1 PRE-084 (32 mg/kg, s.c.) no alteró la hipersensiblidad mecánica, al frio o al calor de los ratones (Figura 3A-C). Sin embargo, cuando el PRE-084 fue administrado 5 minutos antes del S1RA, los efecto antialodinicos y antihiperalgésicos del S1RA fueron significativamente abolidos (Figura 3A-C), sugiriendo que los efectos del S1RA son mediados por el antagonismo farmacológico de los receptores σ_1

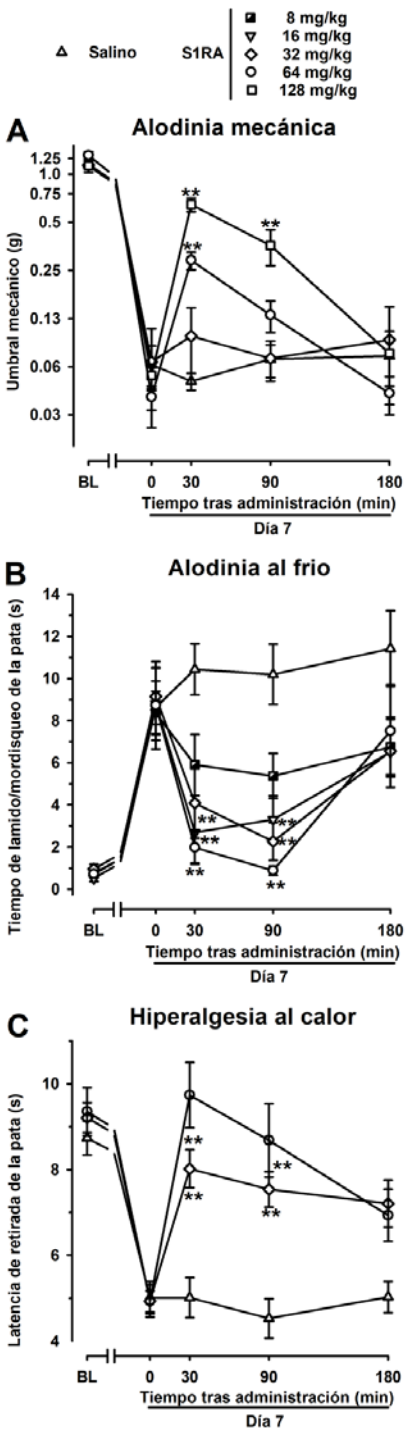


Fig. 2. Curso temporal de los efectos de la administración aguda de S1RA (8-128 mg/kg; s.c.) o salino en la alodinia mecánica (A), la alodinia al frio (B) y la hiperalgesia al calor (C), 7 días tras el SNI. El umbral de fuerza necesario para retirar la pata en el test de von Frey (A), la duración del tiempo de lamido/mordisqueo de la pata en el test de la acetona (B), y la latencia de retirada de la pata en el test de Hargreaves (C) fueron medidos el día antes de la cirugía (medida basal, BL), y el día 7 después de la cirugía, fueron evaluados inmediatamente antes (tiempo 0) y a los 30, 90 y 180 minutos después de la administración de

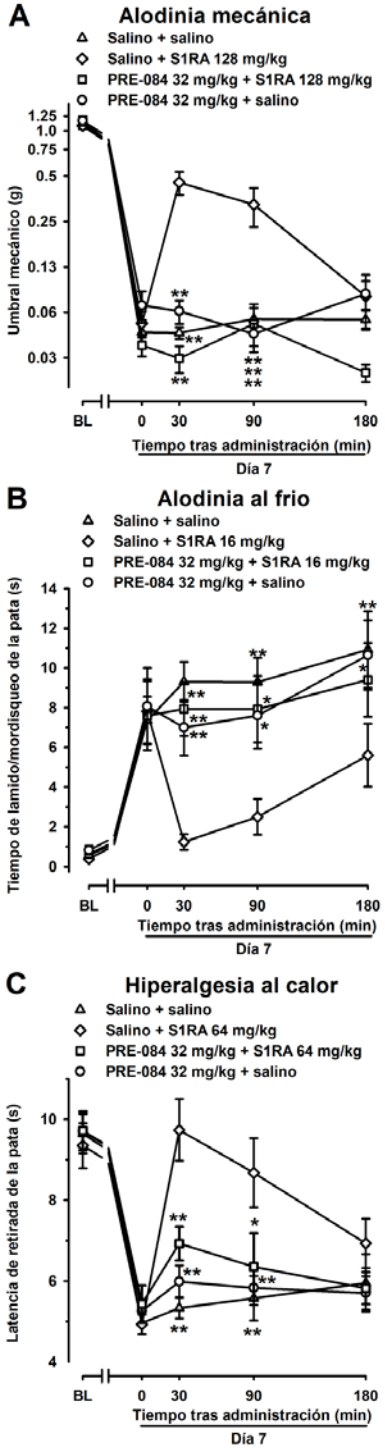


Fig. 3. El agonista del receptor σ_1, PRE-084, revirtió los efectos del antagonista σ_1, S1RA, en ratones con SNI 7 días después de la cirugía en la pata ipsilateral. La alodinia mecánica (A), la alodinia al frio (B), y la hiperalgesia al calor (C) fueron medidos el día antes de la cirugía (medida basal, BL), y 7 días después de la cirugía, fueron evaluados inmediatamente antes (tiempo 0) y a los 30, 90 y 180 minutos después de la administración de los fármacos o salino en la pata ipsilateral. Cada punto y líneas verticales representa la media ± SEM de los valores obtenidos en 8-14 animales. Diferencias

S1RA o salino en la pata ipsilateral. Cada punto y líneas verticales representa la media ± SEM de los valores obtenidos en 8-11 animales. Diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los grupos tratados con S1RA y con salino en el mismo día después del tratamiento: * P < 0.05; ** P < 0.01 (ANOVA de doble vía de medidas repetidas seguido del test de Bonferroni).

estadísticamente significativas entre los valores de los grupos tratados con salino+S1RA y otros tratamientos en el mismo día después del tratamiento: * P < 0.05; ** P < 0.01 (ANOVA de doble vía de medidas repetidas seguido del test de Bonferroni)

Discusión

En este estudio, hemos utilizado un antagonista selectivo del receptor σ_1, S1RA, para estudiar el papel de este receptor en el dolor neuropático asociado a una neuropatía inducida tras la sección de un nervio periférico (modelo SNI) en ratón. Se trata del primer estudio donde se evalúa el papel del receptor σ_1 en un modelo de neuropatía por sección de nervio, en el que además se emplea un antagonista σ_1 en desarrollo clínico, el S1RA, que ha mostrado eficacia en pacientes con dolor neuropático inducido por quimioterapia (24).

Nuestros resultados ponen de manifiesto que los animales sometidos a la cirugía del SNI, desarrollan alodinia mecánica y al frio, e hiperalgesia térmica, con unos cursos temporales, que son comparables a los descritos en trabajo previos (29, 30). Nuestros datos también son concordantes con estos estudios previos que muestran que los animales controles Sham, no muetran ningún tipo de comportamiento indicativo de dolor neuropático (29, 30).

En el presente estudio, nosotros demostramos que tanto la alodinia mecánica, como la alodinia al frio, así como la hiperalgesia al calor fueron atenuadas de forma dosis dependiente por la administración aguda del antagonista σ_1 S1RA. El efecto del S1RA es selectivo sobre el receptor σ_1, ya que la administración previa del agonista σ_1 PRE-084, impide el efecto antinociceptivo del S1RA. Por tanto, estos datos sugieren que el receptor σ_1 juega un papel clave en la hipersensibilidad dolorosa asociada a la neuropatía inducida por la sección del nervio ciático en el ratón, una vez que está establecida. El S1RA no altera los umbrales sensoriales normales de los ratones y solo en condiciones de sensibilización (tras el SNI), produce efectos antialodínicos y antihiperalgésicos, permitiendo recuperar los umbrales nociceptivos hasta las condiciones basales. Nuestros datos concuerdan con otros estudios publicados que ponen de manifiesto que el S1RA y otros

antagonistas σ_1 selectivos reducen la hipersensibilidad dolorosa en diversos modelos de dolor neuropático de diversa etiología (7, 14, 15, 16, 31).

En modelos preclínicos de dolor neuropático, se ha demostrado que el receptor σ_1 también juega un papel importante en el desarrollo de algunas de las conductas indicativas de dolor, ya que ratones desprovistos de este receptor (ratones knockout σ_1) no desarrollan alodinia mecánica ni al frío inducida por quimioterapia (14) o por ligadura del nervio ciático (13), aunque sí desarrollan de forma normal hiperalgesia térmica (13). En la misma línea, el tratamiento preventivo con antagonistas σ_1, incluyendo el S1RA, también consigue impedir el desarrollo de alodinia mecánica y al frío inducida por quimioterapia (14). Además, también se ha descrito un incremento de la expresión de los receptores σ_1 en paralelo al desarrollo de alodinia, en un modelo de dolor neuropático por compresión de los ganglios de las raíces dorsales (32).

Por tanto, investigaciones previas ponen de manifiesto que el receptor σ_1 podría modular el desarrollo de dolor neuropático en modelos preclínicos (13, 14, 32). Sin embargo, el papel del receptor σ_1 en el desarrollo del dolor neuropático inducido por la sección parcial del nervio ciático se desconoce en la actualidad. El presente trabajo sienta las bases para futuras investigaciones con el modelo de SNI mediante ratones mutantes desprovistos del receptor σ_1, o mediante tratamientos preventivos o de larga duración con antagonistas σ_1, durante la fase de desarrollo de la neuropatía. Estas investigaciones, serían muy interesantes, pues además de incrementar nuestro conocimiento sobre el papel del receptor σ_1 en los mecanismos del desarrollo de dolor neuropático, teniendo en cuenta que el S1RA está en desarrollo clínico para el dolor neuropático inducido por quimioterapia, podría abrir la puerta al desarrollo de terapias en base a este receptor, que podrían prevenir o minimizar la aparición de dolor neuropático inducido por lesión mecánica de nervios durante diferentes procesos quirúrgicos, como toracotomías o mastectomias (22).

Bibliografía

1. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN. (2017). Neuropathic pain. Nat Rev Dis Primers. 3, 17002.

2. van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. (2014). Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. Pain. 155(4), 654-62.

3. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice AS, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M. (2015). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. Lancet Neurol. 14(2), 162-73.

4. Sánchez-Fernández C, Entrena JM, Baeyens JM, Cobos EJ. (2017). Sigma-1 Receptor Antagonists: A New Class of Neuromodulatory Analgesics. Adv Exp Med Biol. 964, 109-132.

5. Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Baeyens JM. (2005). Antinociceptive effects of haloperidol and its metabolites in the formalin test in mice. Psychopharmacology (Berl). 182(4), 485-93.

6. Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Montoliu L, Baeyens JM. Formalin-induced pain is reduced in sigma(1) receptor knockout mice. Eur J Pharmacol. 511(1), 73-4.

7. Kang DW, Moon JY, Choi JG, Kang SY, Ryu Y, Park JB, Lee JH, Kim HW. (2016). Antinociceptive Profile of Levo-tetrahydropalmatine in Acute and Chronic Pain Mice Models: Role of spinal sigma-1 receptor. Sci Rep. 6, 37850.

8. 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.

9. Tejada MA, Montilla-García A, Cronin SJ, Cikes D, Sánchez-Fernández C, González-Cano R, Ruiz-Cantero MC, Penninger JM, Vela JM, Baeyens JM, Cobos EJ. (2017). Sigma-1 receptors control immune-driven peripheral opioid analgesia during inflammation in mice. Proc Natl Acad Sci. 114(31), 8396-8401.

10. Gris G, Merlos M, Vela JM, Zamanillo D, Portillo-Salido E. (2014). S1RA, a selective sigma-1 receptor antagonist, inhibits inflammatory pain in the carrageenan and complete Freund's adjuvant models in mice. Behav Pharmacol. 25 (3), 226-35.

11. Entrena JM, Cobos EJ, Nieto FR, Cendán CM, Baeyens JM, Del Pozo E. (2009). Antagonism by haloperidol and its metabolites of mechanical hypersensitivity induced by intraplantar capsaicin in mice: role of sigma-1 receptors. Psychopharmacology (Berl). 205(1), 21-33.

12. Entrena JM, Cobos EJ, Nieto FR, Cendán CM, Gris G, Del Pozo E, Zamanillo D, Baeyens JM. (2009). Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice. Pain. 143(3), 252-61.

13. de la Puente B, Nadal X, Portillo-Salido E, Sánchez-Arroyos R, Ovalle S, Palacios G, Muro A, Romero L, Entrena JM, Baeyens JM, López-García JA, Maldonado R, Zamanillo D, Vela JM. (2009). Sigma-1 receptors regulate activity-induced spinal sensitization and neuropathic pain after peripheral nerve injury. Pain. 145(3), 294-303.

14. Nieto FR, Cendán CM, Sánchez-Fernández C, Cobos EJ, Entrena JM, Tejada MA, Zamanillo D, Vela JM, Baeyens JM. (2012). Role of sigma-1 receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. J Pain. 13(11), 1107-21.

15. Castany S, Gris G, Vela JM, Verdú E, Boadas-Vaello P. (2018). Critical role of sigma-1 receptors in central neuropathic pain-related behaviours after mild spinal cord injury in mice. Sci Rep. 8(1), 3873.

16. Romero L, Zamanillo D, Nadal X, Sánchez-Arroyos R, Rivera-Arconada I, Dordal A, Montero A, Muro A, Bura A, Segalés C, Laloya M, Hernández E, Portillo-Salido E, Escriche M, Codony X, Encina G, Burgueño J, Merlos M, Baeyens JM, Giraldo J, López-García JA, Maldonado R, Plata-Salamán CR, Vela JM. (2012). Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. Br J Pharmacol. 166(8), 2289-306.

17. Gris G, Portillo-Salido E, Aubel B, Darbaky Y, Deseure K, Vela JM, Merlos M, Zamanillo D. (2016). The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different aetiology in rats. Sci Rep. 6, 24591.

18. Roh DH, Kim HW, Yoon SY, Seo HS, Kwon YB, Kim KW, Han HJ, Beitz AJ, Na HS, Lee JH. (2008). Intrathecal injection of the sigma(1) receptor antagonist BD1047 blocks both mechanical allodynia and increases in spinal NR1 expression during the induction phase of rodent neuropathic pain. Anesthesiology. 109(5), 879-89.

19. Casals-Díaz L, Vivó M, Navarro X. (2009). Nociceptive responses and spinal plastic changes of afferent C-fibers in three neuropathic pain models induced by sciatic nerve injury in the rat. Exp Neurol. 217(1), 84-95.

20. Griffin RS, Costigan M, Brenner GJ, Ma CH, Scholz J, Moss A, Allchorne AJ, Stahl GL, Woolf CJ. (2007). Complement induction in spinal cord microglia results in anaphylatoxin C5a-mediated pain hypersensitivity. J Neurosci. 27(32), 8699-708.

21. Costigan M, Belfer I, Griffin RS, Dai F, Barrett LB, Coppola G, Wu T, Kiselycznyk C, Poddar M, Lu Y, Diatchenko L, Smith S, Cobos EJ, Zaykin D, Allchorne A, Gershon E, Livneh J, Shen PH, Nikolajsen L, Karppinen J, Männikkö M, Kelempisioti A, Goldman D, Maixner W, Geschwind DH, Max MB, Seltzer Z, Woolf CJ. (2010). Multiple chronic pain states are associated with a common amino acid-changing allele in KCNS1. Brain. 133(9), 2519-27.

22. Borsook D, Kussman BD, George E, Becerra LR, Burke DW. (2013). Surgically induced neuropathic pain: understanding the perioperative process. Ann Surg. 257(3), 403-12.

23. Abadias M, Escriche M, Vaqué A, Sust M, Encina G. (2013). Safety, tolerability and pharmacokinetics of single and multiple doses of a novel sigma-1 receptor antagonist in three randomized phase I studies. Br J Clin Pharmacol. 75(1), 103-17.

24. Bruna J, Videla S, Argyriou AA, Velasco R, Villoria J, Santos C, Nadal C, Cavaletti G, Alberti P, Briani C, Kalofonos HP, Cortinovis D, Sust M, Vaqué A, Klein T, Plata-Salamán C. (2018). Efficacy of a Novel Sigma-1 Receptor Antagonist for Oxaliplatin-Induced Neuropathy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase IIa Clinical Trial. Neurotherapeutics. 15(1), 178-189.

25. Bourquin AF, Süveges M, Pertin M, Gilliard N, Sardy S, Davison AC, Spahn DR, Decosterd I. (2006). Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. Pain. 122(1-2), 14.

26. Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendan CM, Del Pozo E. (2008). Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. Curr Neuropharmacol. 6 (4), 344–366.

27. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM YT. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J. Neurosci. Methods. 53(1), 55–63.

28. Nieto FR, Entrena JM, Cendán CM, Del Pozo E, Vela JM, Baeyens JM. (2008). Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. Pain. 137(3), 520–531.

29. Guida F, Lattanzi R, Boccella S, Maftei D, Romano R, Marconi V, Balboni G, Salvadori S, Scafuro MA, de Novellis V, Negri L, Maione S, Luongo L. (2015). PC1, a non-peptide PKR1-preferring antagonist, reduces pain behavior and spinal neuronal sensitization in neuropathic mice. Pharmacol Res. 91, 36-46.

30. Liu S, Mi WL, Li Q, Zhang MT, Han P, Hu S, Mao-Ying QL, Wang YQ. (2015). Spinal IL-33/ST2 Signaling Contributes to Neuropathic Pain via Neuronal CaMKII-CREB and Astroglial JAK2-STAT3 Cascades in Mice. Anesthesiology. 123(5), 1154-69.

31. Paniagua N, Girón R, Goicoechea C, López-Miranda V, Vela JM, Merlos M, Martín Fontelles MI. (2017). Blockade of sigma 1 receptors alleviates sensory signs of diabetic neuropathy in rats. Eur J Pain. 21(1), 61-72.

32. Son JS, Kwon YB. (2010). Sigma-1 Receptor Antagonist BD1047 Reduces Allodynia and Spinal ERK Phosphorylation Following Chronic Compression of Dorsal Root Ganglion in Rats. Korean J Physiol Pharmacol. 14(6), 359-64.

Capítulo 12

Los receptores sigma-1 controlan la analgesia opioide mediada por células inmunitarias durante la inflamación

Tejada MA, Montilla-García A, Cronin SJ, Cikes D, Sánchez-Fernández C, González-Cano R, Ruiz-Cantero MC, Penninger JM, Vela JM, Baeyens JM, Cobos EJ

Resumen

El bloqueo de los receptores sigma-1 potencia el efecto antinociceptivo de los fármacos opioides, debido a que estos receptores constituyen un freno biológico a la analgesia opioide. El papel de este proceso fisiopatológico es desconocido. Nuestro objetivo fue comprobar si el antagonismo sigma-1 reduce el dolor inflamatorio en ratones, a través de una desinhibición del sistema opioide endógeno. Los antagonistas selectivos sigma-1, BD-1063 y S1RA, abolieron la hiperalgesia mecánica y térmica en ratones con una inflamación aguda inducida por carragenina. El efecto antihiperalgesico del bloqueo de los receptores sigma-1 fue revertido por los antagonistas opioides naloxona y naloxona metiodida, y por la administración en el foco inflamatorio del anticuerpo monoclonal 3-E7, el cual reconoce la secuencia pan-opioide de la mayoría de los POEs. Los neutrófilos constituyen el principal infiltrado inmunitario en una inflamación aguda, y expresan pro-opiomelanocortina, el precursor de β-endorfina (un conocido POE). Los niveles de β-endorfina aumentaron en la pata inflamada; este incremento y el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1 fueron eliminados cuando se redujo el número de neutrófilos con la administración in vivo del anticuerpo anti-Ly6G. Este efecto antihiperalgésico opioide dependiente de los antagonistas sigma-1 se mantuvo a los 5 días desde la administración de la carragenina, donde el infiltrado inmunitario predominante eran macrófagos/monocitos los cuales también expresaron pro-opiomelanocortina. Estos resultados sugieren que las células inmunitarias capaces de liberar POEs son necesarias para el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1 durante la inflamación. En

conclusión, los receptores sigma-1 disminuyen la analgesia opioide periférica de las células inmunitarias, y los antagonistas sigma-1 producen una analgesia opioide local debido a una mejor acción de los POEs de origen inmunitario, maximizando el potencial analgésico de las células inmunitarias que de forma natural se acumulan en la zona inflamada.

Introducción

Actualmente se necesitan nuevos fármacos analgésicos que actúen a través de mecanismos de acción diferentes a los conocidos (1). El receptor sigma-1 actúa como una chaperona, el cual puede modificar la función de varios receptores y canales implicados en la neurotransmisión (2), y ha sido el foco de intensos estudios en la investigación preclínica como una nueva diana farmacológica para el tratamiento del dolor (3, 4). El papel del receptor sigma-1 en el dolor neuropático ha sido intensamente estudiado, y se ha demostrado ampliamente que la inhibición de este receptor disminuye la sensibilización central (3), el cual juega un papel importante en este tipo de dolor (5). Entre los antagonistas selectivos sigma-1, los mejores caracterizados son el BD-1063 y el S1RA (3), este último compuesto se encuentra actualmente en estudios de fase II en ensayos clínicos con una indicación para el tratamiento del dolor neuropático (4), después de superar satisfactoriamente los estudios de fase I donde demostraron su seguridad y tolerabilidad en personas sanas (6). Otra indicación para este antagonista sigma-1 es la mejora de la analgesia opioide (4). La potenciación de la antinocicepción opioide por los antagonistas sigma-1 ya fue descrita a principio de los 90 (7). Estudios posteriores mostraron que la mejora de la antinocicepción opioide por el bloqueo de los receptores sigma-1 es producido a nivel central (8) y es particularmente prominente en la periferia (9, 10). Este marcado efecto de la potenciación opioide por el antagonismo sigma-1 periférico concuerda con una mayor densidad de estos receptores en los ganglios de la raíz dorsal que en varias áreas del sistema nervioso central (10). Además, estos receptores en los ganglios de la raíz dorsal están localizados en las neuronas sensoriales y no en las células gliales (11). Se sabe que el receptor sigma-1 puede formar un complejo macromolecular con los receptores opioides, inhibiendo tónicamente la función de este receptor, y que los antagonistas sigma-1 pueden proteger a los receptores

opioides de este efecto inhibitorio tónico, mejorando así la analgesia opioide (12, 13). Sin embargo, aunque el papel de los antagonistas sigma-1 en la potenciación de la analgesia de los fármacos opioides es claro, el papel de los receptores sigma-1 en la modulación opioide en procesos fisiológicos o fisiopatológicos aún se desconoce.

El papel de los receptores sigma-1 en el dolor patológico, aparte del dolor neuropático, ha sido menos explorado, pero recientes estudios han mostrado que el antagonismo sigma-1 puede mejorar la hiperalgesia inflamatoria (14). Las células inmunitarias que llegan al foco inflamatorio pueden producir y liberar algógenos químicos que participan en la sensibilización de los nociceptores; por ello, las células inmunitarias producen dolor durante un proceso inflamatorio (15). Estas células inmunitarias pueden también producir péptidos opioides endógenos (POEs) (16), pero a pesar del potencial analgésico de estos POEs, el resultado final del proceso inflamatorio es normalmente la producción de dolor. No se sabe si estos receptores sigma-1 pueden disminuir el efecto antinociceptivo de los POEs durante la inflamación y por ello facilitan la aparición del dolor inflamatorio.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue explorar si la inhibición de este receptor podría mejorar la hiperalgesia inflamatoria por desinhibición de la acción de los POEs periféricos de origen inmunitario. Si este fuera el caso, podría constituir un mecanismo analgésico innovador que expandiría el potencial terapéutico de los antagonistas sigma-1.

Materiales y Métodos

- **Animales de experimentación**

Todos los experimentos se realizaron en ratones hembras de la cepa CD1 wild-type (WT) (Charles River, Barcelona, España) y sigma-1 knockout (σ_1-KO) (Laboratorios Esteve, Barcelona, España), con un peso entre 25-30 g. Todos los animales fueron estabulados en habitaciones con una temperatura controlada (22±2 ºC) y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (08:00-20:00 h). Los protocolos para el uso de animales fueron aprobados por las autoridades regionales (Junta de Andalucía) e institucionales (Comité de Ética para Investigación de la Universidad de Granada).

- **Inflamación producida por carragenina**

La inflamación de la pata fue producida por la administración intraplantar (i.pl.) de 50 µl de carragenina al 1% en salino (14). El edema de la pata fue evaluado mediante un pletismometro (14). Los experimentos de inflamación aguda fueron realizados a las 3 h, y los de inflamación sostenida a los 5 días desde la administración de la carragenina.

- **Fármacos y anticuerpos**

Los antagonistas sigma-1 fueron el BD-1063 y el S1RA (17, 20) y el agonista sigma-1 fue el PRE-084 (20). El antagonista opioide capaz de penetra al sistema nervioso central fue naloxona hidroclorada, y el restringido sólo a la periferia fue su análogo naloxona metiodida (18). El anticuerpo monoclonal 3-E7 que reconoce la secuencia panopioide Tyr-Gly-Gly-Phe del extremo N-terminal de la mayoría de los POEs (21), fue administrado i.pl. para bloquear el efecto de los POEs. El anticuerpo frente al Ly6G se administró por vía intraperitoneal para inhibir la infiltración neutrofílica (24).

- **Experimentos comportamentales**

La hiperalgesia mecánica fue evaluada mediante el test de presión de la pata, donde se les aplicó una presión constante con una intensidad de 100 g en la parte dorsal de la pata trasera hasta que el animal mostró una respuesta de forcejeo (14). Para evaluar la hiperalgesia térmica usamos el test de Hargreaves, donde a los animales habituados sobre una placa de cristal atemperada a 30 ºC se les estimuló con un haz de luz caliente en la superficie plantar de la pata trasera hasta que el animal retiró la pata (14).

- **Niveles de β-endorfina en pata**

Los niveles de β-endorfina fueron determinados mediante un kit de inmunoensayo enzimático fluorescente en el tejido blando de la pata, donde se eliminó el hueso.

- **Citometría de flujo (FACS)**

Para identificar las células inmunitarias que llegan al foco inflamatorio se disgregó el tejido de la superficie plantar de la pata inflamada y se pasaron por un citómetro de flujo. Para identificar a los neutrófilos usamos los marcadores CD45 (células hematopoyéticas), CD11b (células mieloides) y Ly6G (integrina específica de los neutrófilos). Para identificar la población de macrófagos/monocitos usamos la combinación de los marcadores CD11b y Ly6G.

- **PCR**

Los transcritos para la pro-opiomelanocortina (POMC) y del ARN ribosomal 18S (como control interno) fueron amplificados usando una RT-PCR a tiempo real a partir de muestras de neutrófilos y macrófagos/monocitos purificados por FAC-sorting.

Resultados y Discusión

Efecto de los antagonistas sigma-1 sobre la hiperalgesia inflamatoria aguda es sensible a los antagonistas opioides. Los ratones mostraron un desarrollo significativo de la hiperalgesia mecánica (Figura 1A) y térmica (Figura 1B) en la inflamación aguda inducida por carragenina. La administración sistémica de los antagonistas sigma-1, BD-1063 y S1RA, revirtieron por completo esta hiperalgesia mecánica y térmica (Figura 1 A y B), estas dosis no modificaron la respuesta comportamental en animales sin inflamación (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con la ya sabida ausencia de efecto de los antagonistas sigma-1 sobre el dolor nociceptivo inducido por estímulos mecánico y térmicos (9, 17) y con la mejora que ellos producen sobre la hiperalgesia inflamatoria (14). Al contrario que los antagonistas sigma-1, el agonista PRE-084 no produjo ningún efecto dosis respuesta en la hiperalgesia inflamatoria, ni tampoco modificó el tiempo de respuesta en animales sin inflamación (datos no mostrados), pero sí que fue capaz de revertir por completo el efecto antihiperalgesico del BD-1063 y S1RA (Figura 1 A y B). Estos resultados demuestran el papel de los receptores sigma-1 en el efecto antihiperalgesicon de ambos fármacos.

Otro punto interesante fue que la mejora sobre la hiperalgesia mecánica y térmica producida por los antagonistas sigma-1 también fue revertida por los

antagonistas opioides naloxona y naloxona metiodida (Figura 1 A y B). Para comprobar la especificidad del efecto de los antagonistas opioides, se usó como fármaco antihiperalgésico un antiinflamatorio no esteroideo como el ibuprofeno, y un agonista opioide como es la morfina. Ambos fármacos revirtieron la hiperalgesia mecánica y térmica inflamatoria, pero naloxona y naloxona metiodida sólo pudieron revertir el efecto de morfina y no el de ibuprofeno (datos no mostrados). Estos datos muestran que los antagonistas opioides usados no pueden revertir la analgesia producida por fármacos sin acción opioide.

Al contario de naloxona, que tiene acción a nivel del sistema nervioso central, naloxona metiodida sólo actúa en el sistema nervioso periférico debido a que no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (18). Naloxona metiodida puede revertir por completo el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1, lo que nos muestra la importancia del efecto analgésico de estos fármacos en la periferia. De hecho, la administración intraplantar (i.pl.) del S1RA en el foco inflamatorio fue capaz de abolir completamente la hiperalgesia mecánica y térmica, y este efecto también pudo ser revertido por el agonista sigma-1 PRE-084, y por el antagonista periférico naloxona metiodida (Figura 1 A y B).

Por el contrario, el incremento de las dosis de BD-1063 o S1RA no pudo revertir la inhibición inducida por naloxona metiodida sobre la hiperalgesia mecánica (Figura 1 C y D) ni térmica (Figura 1 E y F), debido a que existe una inhibición no competitiva entre naloxona metiodida y los antagonistas sigma-1. Naloxona metiodida no se une a los receptores sigma-1 (10), ni los antagonistas sigma-1 lo hacen a los receptores opioides (9, 17). Sin embargo, los receptores sigma-1 pueden formar un complejo macromolecular con los receptores opioides produciendo una inhibición tónica del efecto de estos receptores (12, 13). Se sabe que el antagonismo sigma-1 incrementa la señalización de los agonistas opioides, produciendo una potenciación de la analgesia opioide (12, 13). Por lo tanto, una posible explicación para la reversión del efecto de los antagonistas sigma-1 por naloxona metiodida es que está lo haga a través de los receptores opioides, impidiendo la acción de agonistas opioides endógenos liberados en el foco inflamatorio (cuya acción es incrementada con los antagonistas sigma-1), por lo que nos encontramos con una inhibición no competitiva del efecto antihiperalgesico del BD-1063 y S1RA. Esta hipótesis implica que durante la

inflamación, se incrementa la producción de péptidos opioides endógenos en el foco inflamatorio, los cuales pueden ser modulados por los receptores sigma-1.

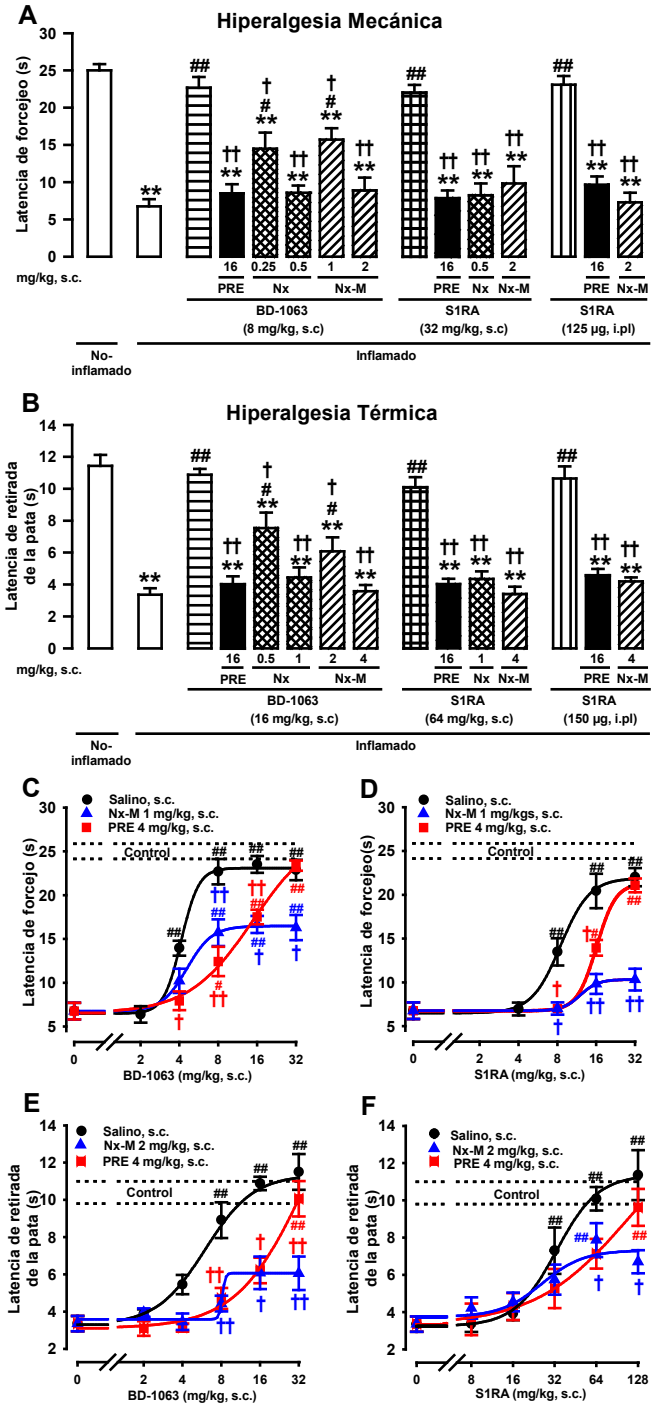


Fig. 1. Reversión del efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1 por los antagonistas opioides y el agonista sigma-1 durante una inflamación aguda. Los ratones fueron evaluados 3 h después de la inyección i.pl. de carragenina (iflamados) o salino (no-inflamados). Los antagonistas sigma-1 fueron administrados por vía s.c. o i.pl., el PRE-084 (PRE), naloxona (Nx), y naloxona metiodida (Nx-M) fueron administrados por vía s.c. Efecto inducido por una única dosis de los antagonistas sigma-1 BD-1063 (BD) o S1RA sobre la hiperalgesia en estímulos mecánicos (A) o térmicos (B) y la reversión por el agonista sigma-1 PRE y los antagonistas opioides Nx y Nx-M. Curva dosis respuesta del efecto producido a estímulos mecánicos por el BD-1063 (C) y S1RA (D) y a estímulos térmicos para el BD-1063 (E) y S1RA (F) en la hiperalgesia inducida por carragenina. Los antagonistas sigma-1 fueron administrados solos o con una dosis fija de PRE, Nx-M o su solvente. La línea de puntos (control) representa la media ± SEM de ratones sin inflamación. Las barras o puntos muestran la media ± SEM de 8-10 animales. **P< 0,01, ratones sin vs. ratones con inflamación (para aclarar esta comparación se ha omitido in C-F); #P< 0,05, ##P< 0,01,ratones con inflamación tratados con los antagonistas sigma-1 vs. ratones con inflamación tratados con el solvente; †P< 0,05, ††P< 0,01, ratones con inflamación tratados con antagonistas sigma-1 solo vs. ratones inflamados tratados con PRE, Nx o Nx-M, el análisis usado fue una ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni.

- **El antagonismo opioide periférico inhibe de manera no competitiva el efecto de los antagonistas sigma-1 sobre la hiperalgesia inflamatoria.**

Para comprobar si el PRE-084 o naloxona metiodida inhiben el efecto antihiperalgesico del BD-1063 y del S1RA de manera competitiva o no competitiva, hicimos una curva dosis respuesta de los antagonistas sigma-1 con una dosis fija de PRE-084 o naloxona metiodida (19). La inhibición del PRE-084 sobre el efecto antihiperalgésico del BD-1063 y S1RA, fue contrarestado incrementando la dosis de los antagonistas sigma-1 tanto en la hiperalgesia mecánica (Figura 1 C y D) como térmica (Figura 1 E y F). Esto indica que existe una interacción competitiva entre los antagonistas sigma-1 y el PRE-084. Estos datos concuerdan con el perfil farmacológico de estos fármacos, los cuales se sabe que se unen a los receptores sigma-1 (17, 20).

- **POEs y el antagonismo sigma-1 durante una inflamación aguda.**

Para estudiar la acción de los POEs en el foco inflamatorio, estos se neutralizaron con la administración local de un anticuerpo monoclonal llamado 3-E7, el cual reconoce la secuencia panopioide Tyr-Gly-Gly-Phe del extremo N terminal de la mayoría de los POEs (21). La administración i.pl. del 3-E7 no modificó la respuesta comportamental en animales con y sin inflamación a estímulos mecánicos ni térmicos (Figura 2 A y C), indicando que incluso cuando los POEs están presentes en la pata inflamada, los niveles de estos no son suficientes para revertir la hiperalgesia inflamatoria. Sin embargo, la administración del 3-E7 en la pata inflamada es capaz de abolir el efecto antihiperalgésico de del BD-1063 y S1RA en estímulos mecánicos y térmicos (Figura 2 A y C). La misma dosis del isotipo como control del anticuerpo no alteró la respuesta comportamental en animales con y sin inflamación, independientemente de si fueron o no tratados con los antagonistas sigma-1 (Figura 2 A y C). El efecto del anticuerpo 3-E7 sobre el efecto antihiperalgesico del BD-1063 y S1RA sólo se vio cuando se inyectó en la pata inflamada, ya que cuando se administró en la pata contralateral no pudo revertir el efecto antihiperalgesico de los antagonistas sigma-1 (Figura 2 B y D). Estos resultados muestran que el efecto antihiperalgésico del BD-1063 y S1RA es debido a la acción de los POEs en el foco inflamatorio.

Desde principio de los 90, se sabe que los antagonistas sigma-1 potencian el efecto analgésico de los fármacos agonistas opioides, lo que sugería que el receptor sigma-1 forma un sistema antiopioide al inhibir de forma tónica la analgesia producida por los fármacos opioides a nivel del sistema nervioso central (7). Nuestros datos muestran, que en la periferia, una inhibición tónica de la analgesia opioide es producida fisiológicamente durante un proceso inflamatorio por los receptores sigma-1, impidiendo que los POES puedan producir analgesia, facilitándose de esta manera la aparición del dolor inflamatorio.

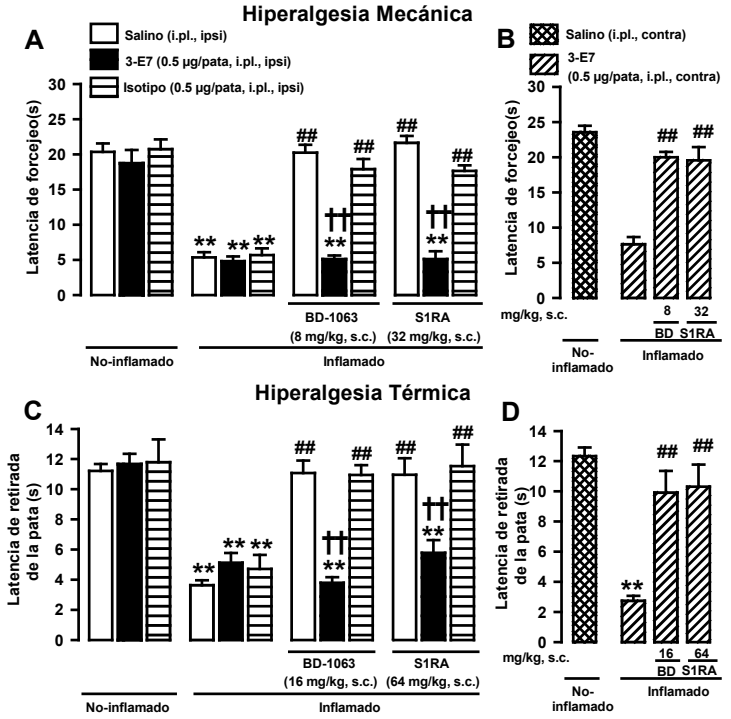
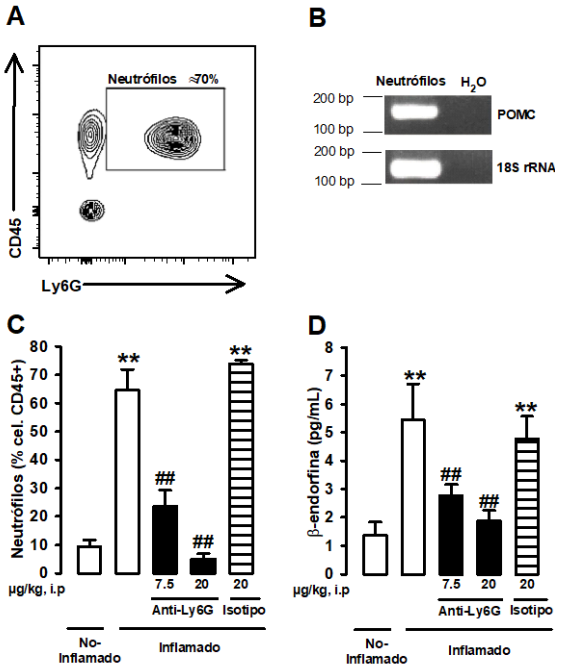


Fig 2. Los POEs participan en el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1 en el foco inflamatorio. Los ratones fueron evaluados 3 h después de la inyección de carragenina (inflamados) o salino (no-inflamados). Los animales fueron tratados con los antagonistas sigma-1 (BD-1063 y S1RA) o sus solventes por vía s.c., y evaluados en estímulos mecánicos (A y B) o térmicos (C y D). Los ratones también fueron tratados por vía i.pl. con el 3-E7 anti-POEs, un anticuerpo monoclonal frente a los POEs, su isotipo o el solvente en la misma pata inyectada con carragenina o salino (ipsi), (A y C), o en la pata contralateral (contra) a la carragenina (B y D). Todos los ratones fueron estimulados en la pata inyectada con carragenina o su solvente. Las barras muestran la media ± SEM de 8-10 ratones. **P< 0,01, ratones sin inflamación tratados con el solvente de los fármacos o anticuerpos vs. ratones con inflamación; $^{\#\#}$P< 0,01, ratones con inflamación tratados con los antagonistas sigma-1 vs. ratones con inflamación tratados con el solvente; ††P< 0,01, ratones con inflamación tratados con los antagonistas sigma-1 solos vs. ratones con inflamación tratados con el anticuerpo 3-E7 en la pata inflamada; ANOVA de una vía seguida del test de Bonferroni.

- **Neutrófilos y POEs**

Sabemos que existen POEs en el área inflamada, pero no de donde proceden. Las células inmunitarias son capaces de producir y liberar POEs (16, 22), las cuales se acumulan en el foco inflamatorio. Para conocer qué tipo de células inmunitarias encontramos en nuestro modelo inflamatorio inducido por carragenina, realizamos una citometría de flujo (FACS) con marcadores específicos para las células hematopoyéticas predominantes (CD45+). Los neutrófilos (CD45+CD11b+Ly6G) constituyeron la población principal (sobre el 70%) de las células inmunitarias en la pata inflamada 3 h después de la carragenina (Figura 3 A), tal y como era de esperar en una inflamación aguda. También estuvieron presentes macrófagos/monocitos (CD45+CD11b+Ly6G-) aunque en menor proporción (sobre el 10% de las células CD45+) (datos no mostrados). Como los neutrófilos fueron el tipo de células mieloides predominantes en la pata inflamada, y se sabe que estas células producen β-endorfina (23), determinamos si los neutrófilos son capaces de producir estos POEs en nuestras condiciones experimentales. Encontramos que los neutrófilos expresan ARN mensajero para la pro-opiomelanocortina (POMC) (Figura 3 B), precursor de la β-endorfina (16). Existe una proteína presente de forma selectiva en los neutrófilos y que es necesaria para su migración y reclutamiento, esta proteína se llama Ly6G, y su acción puede ser inhibida in vivo por la administración sistémica del anticuerpo anti-Ly6G (24). La administración in vivo del anti-Ly6G pudo inhibir de manera dosis dependiente la llegada de neutrófilos al foco inflamatorio, mientras que la administración de su isotipo no modificó el reclutamiento (Figura 3C). Sin embargo, el tratamiento con anti-Ly6G no tuvo ningún efecto en la infiltración de macrófagos/monocitos en el área inflamada (datos no mostrados). Se vio que los animales con inflamación tenían niveles altos de β-endorfina, y cuando eran administrados con Ly6G donde se reducían el número de neutrófilos, los niveles de β-endorfina también se redujeron de manera dosis dependiente, cosa que no fue capaz de hacer el isotipo (Figura 3D). Estos resultados reflejan el efecto de la eliminación de los neutrófilos mediante la administración del Ly6G, sugiriendo que estas células son capaces de producir POEs en la inflamación aguda inducida por carragenina. β-endorfina es el POE predominante producido por las células inmunitarias (16), y por ello medimos sus niveles en nuestras condiciones

experimentales. Sin embargo, los leucocitos también pueden producir encefalinas o dinorfinas (22), los cuales podrían tener un papel importante en nuestros resultados. Pensamos que los POE producidos por los neutrófilos pueden participar en la reversión de naloxona sobre el efecto antihiperalgesico de los antagonistas sigma-1 en una inflamación aguda.



producción de β-endorfina durante una inflamación aguda producida por carragenina. (A) diagrama que representativo del FACS que muestra las células CD45+Ly6G+ de la pata inflamada, correspondiente a neutrófilos. (B) PCR a tiempo real de ARNm que codifica para la POMC y ARN ribosomal de 18S (18S ARNr) como control interno, de neutrófilos aislados por FACS. (C) Determinación por FACS del efecto sobre la población de neutrófilos en la pata inflamada al ser tratados in vivo con el anti-Ly6G. (D) Efecto sobre los niveles de β-endorfina en la pata inflamada al ser tratados in vivo con el anti-Ly6G, medidos por inmunoensayo enzimático fluorescente. Las muestras se obtuvieron de ratones tratado i.p. con el anticuerpo anti-Ly6G, el isotipo o su solvente 3 h después de la inyección i.pl. con carragenina (inflamados) o salino (no-

Fig 3. Los neutrófilos contribuyen a la inflamados). La gráfica muestra la media ± SEM de una n=6-10 determinaciones. **P< 0,01, ratones sin inflamación vs. con inflamación; ##P< 0,01, ratones con inflamación tratados con el anti-Ly6G vs. ratones con inflamación tratados con el solvente.

- **Neutrófilos, Edema e Hiperalgesia.**

Aunque los neutrófilos (y otras células inmunes) pueden producir POEs y por ello podrían participar en la disminución del dolor durante la inflamación (16), está aceptado que estas células producen dolor por la síntesis y liberación de algógenos químicos (15) y además participan en el desarrollo del edema (24). De hecho, el edema puede incrementar la presión sobre las terminales nerviosas de los nociceptores, lo cual también produce dolor durante un proceso inflamatorio (25). Por lo tanto, vamos a evaluar el efecto del tratamiento con el anti-Ly6G sobre el edema y la hiperalgesia inflamatoria. La carragenina produce una marcada inflamación a las 3 h de su administración, en la cual se estudió el incremento del volumen de la pata (Figura 4A). El anti-Ly6G redujo de manera dosis dependiente el edema, aunque solo parcialmente y a altas dosis (10-20 μg), mientras que el isotipo control del anticuerpo (20 μg) no tuvo ningún efecto (Figura 4A). Estos

resultados concuerdan con lo visto anteriormente, donde una dosis alta del anti-Ly6G mejoraba el edema inflamatorio (24). Ni el tratamiento con el anti-Ly6G ni su isotipo modificaron el tiempo de latencia de respuesta para estímulos mecánicos y térmicos en animales sin inflamación (Figura 4 B y C, respectivamente), indicando que los neutrófilos no juegan un papel importante en la nocicepción aguda para ambos tipos de estímulos. El tratamiento con el anti-Ly6G, pero no con su isotipo, incrementó la latencia de respuesta a estímulos mecánicos en ratones con inflamación (Figura 4B), a las dosis que reducía el edema, mientras que ni el anti-Ly6G ni su isotipo tuvieron ningún efecto sobre la hiperalgesia térmica (Figura 4C). Las neuronas sensoriales periféricas están especializadas en detectar estímulos sensoriales específicos, y por ello, el mecanismo para la nocicepción mecánica y térmica no tienen por qué solaparse (25). Nuestros datos sugieren que los neutrófilos podrían participar en el desarrollo de la hiperalgesia mecánica al producir el edema, el cual incrementa la estimulación por presión de los nociceptores sensitivos, pero además otras fuentes de algógenos químicos aparte de los liberados por estas células inmunitarias explicarían la hipersensibilidad térmica producida por la carragenina.

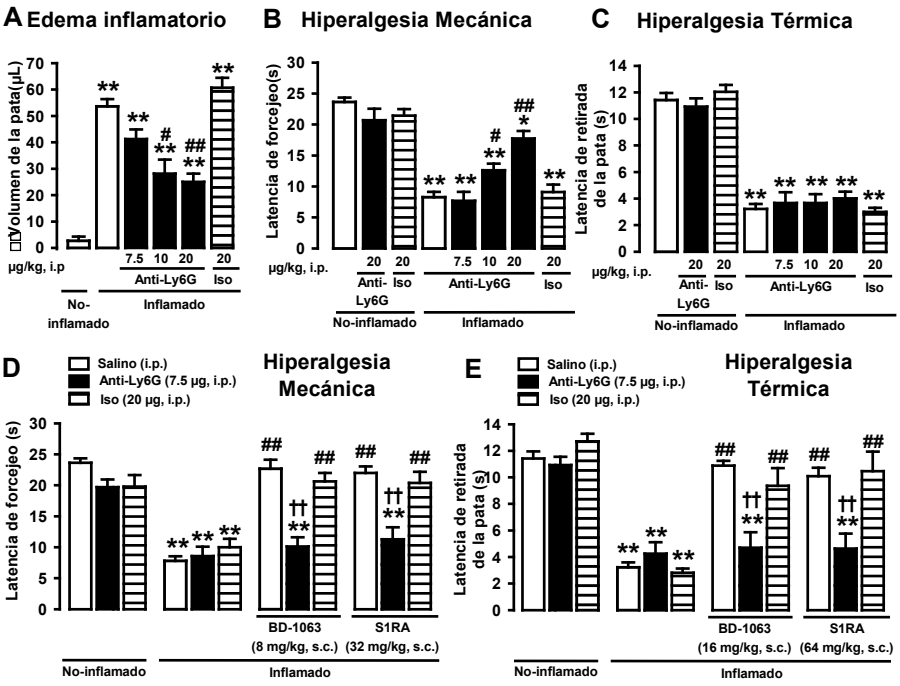


Fig 4. Los neutrófilos participan tanto en la hiperalgesia inflamatoria como en el efecto antihiperalgesico de los antagonistas sigma-1 durante una inflamación aguda. Efecto de la administración del anticuerpo anti-Ly6G en el edema (A), hiperalgesia mecánica (B) y térmica (C), y sobre los efectos de los antagonistas sigma-1 en la hiperalgesia mecánica y térmica (D y E respectivamente). Los ratones fueron tratados con una administración i.p. del anti-Ly6G, su isotipo (iso) o el solvente, y una administración i.pl. de carragenina (inflamados) o salino (no-inflamados) 3

h antes de la evaluación (A-E). Los ratones fueron tratados por vía s.c. con los antagonistas sigma-1 (BD-1063 o S1RA) o su solvente (D y E). Las barras muestran la media ± SEM de 8 a 10 animales. *P< 0,05, **P< 0,01, ratones sin inflamación tratados con el anticuerpo o su solvente vs. ratones con inflamación; #P< 0,05, ##P< 0,01, ratones con inflamación tratados con el anti-Ly6G o los antagonistas sigma-1 solos vs. ratones con inflamación tratados con el solvente; ††P< 0,01, ratones con inflamación tratados con los antagonistas sigma-1 solos vs. ratones con inflamación tratados con el anti-Ly6G; ANOVA de una vía seguida del test de Bonferroni.

- **Influencia de los neutrófilos sobre el efecto producido por los antagonistas sigma-1.**

Se estudió la influencia de los neutrófilos sobre el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1 durante la inflamación aguda inducida por carragenina. Para ello, se usó una dosis intermedia de anti-Ly6G (7,5 µg), la cual fue suficiente para disminuir significativamente el número de neutrófilos infiltrados en el foco inflamatorio sin que modificara significativamente el edema de la pata, ni la respuesta comportamental a estímulos mecánicos y térmicos (Figura 4 D y E, respectivamente). Esta dosis de anti-Ly6G eliminó el efecto antihiperalgésico del BD-1063 y S1RA en la hipersensibilidad mecánica y térmica inflamatoria (Figura 4 D y E, respectivamente), mientras que las altas dosis del isotipo (20µg) no tuvo ningún efecto (Figura 4 D y E). Estos datos sugieren que los efectos observados son específicos. Además, nuestros resultados demuestran que para que el efecto antihiperalgesico de los antagonistas sigma-1 sea sensible a revertir con naloxona, esta necesita de la presencia de POEs producidos por neurófilos (los cuales son la principal fuente de células inmunitarias infiltradas) en el foco inflamatorio.

- **Efecto de los antagonistas sigma-1 sensible a naloxona en una inflamación sostenida.**

Como el tipo de células inmunitarias predominantes varía con el transcurso de la inflamación (21), estudiamos si el efecto antihiperalgesico de los antagonistas sigma-1 sensible a naloxona se mantiene cuando las células inmunitarias predominantes son otras diferentes a los neutrófilos. La presencia de neutrófilos 5 días después de la administración de carragenina fue prácticamente inapreciable, mientras que la de macrófagos/monocitos (células CD11b+Ly6G-) se incrementó, constituyendo las principales células inmunitarias (sobre el 70%) (Figura 5A). Al igual que en los neutrófilos, en los macrófagos/monocitos también se encontraron transcritos de ARNm para la POMC (Figura 5B). Estos datos concuerdan con lo

previamente escrito de que todas las subpoblaciones de células inmunitarias producen POEs (22) y que las distintas líneas de leucocitos son la principal fuente de estos péptidos en las diferentes etapas de la inflamación (21). Bajo estas condiciones de inflamación mantenida, los animales mostraron una hiperalgesia mecánica que pudo ser revertida por los antagonistas sigma-1, el BD-1063 y S1RA (Figura 5C). El efecto de estos antagonistas sigma-1 fue revertido por el agonista sigma-1 Pre-084 y por el antagonista opioide periférico naloxona metiodida (Figura 5C), indicando estos resultados que tanto los receptores sigma-1 y receptores opioides están implicados en el efecto del BD-1063 y S1RA durante una inflamación mantenida, y muestran que la analgesia opioide de origen inmunitario producido por los antagonistas sigma-1 no se limita a una inflamación donde las células predominantes son sólo neutrófilos.

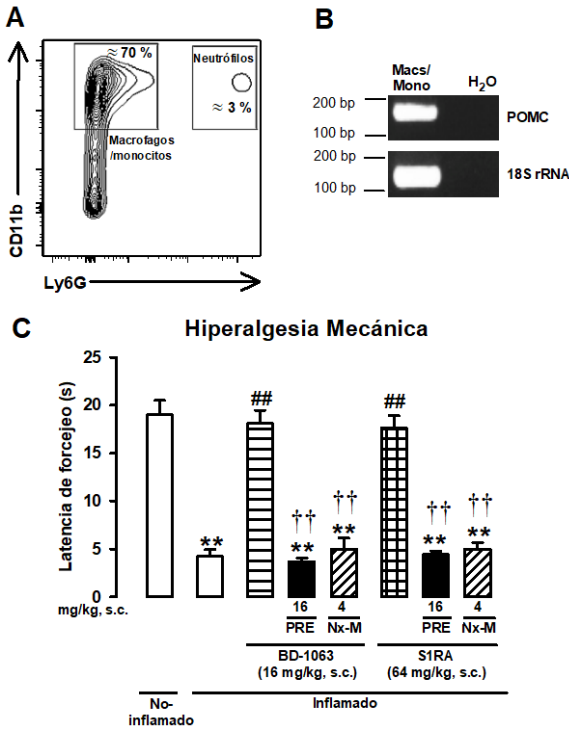


Fig 5. El efecto opioide periférico de los antagonistas sigma-1 en una inflamación sostenida depende de su conservación.
(A) Representación por FACS de la población de células CD45+ en la pata inflamada: CD11b+Ly6G- (macrófagos y monocitos) y CD11b+Ly6G+ (neutrófilos). (B) PCR a tiempo real del ARNm para precursores de la POMC en macrófagos/monocitos aislados por FACS, y PCR del ARN ribosomal (ARNr 18S) como control estándar. (C) Efecto de los antagonistas sigma-1 BD-1063 (BD) o S1RA en la hiperalgesia mecánica. Los ratones recibieron una inyección i.pl. de carragenina (inflamados) o salino (no-inflamados) 5 días antes de la evaluación, y administrados por vía s.c con el agonista PRE-084 (PRE) y el antagonista opioide naloxona metiodida (Nx-M).Las barras muestran la media ± SEM de 8 a 10 animales. **P< 0,01, ratones con inflamación vs. ratones sin inflamación; ##P< 0,01, ratones con inflamación tratados con los antagonistas sigma-1 vs. Ratones con inflamación tratados con el solvente; ††P< 0,01, ratones con inflamación tratados con los antagonistas sigma-1 solos vs. ratones con inflamación tratados con PRE o Nx-M; ANOVA de una vía seguida del test de Bonferroni.

Conclusiones

Los receptores sigma-1 periféricos constituyen un freno biológico a la analgesia opioide de origen inmunitario durante un proceso inflamatorio en el cual las células inmunitarias y otras fuentes de algógenos químicos producen dolor (Figura 6A). Este freno biológico a la antinocicepción opioide puede ser eliminado farmacológicamente por los antagonistas sigma-1, los cuales permiten la analgesia opioide en el foco inflamatorio al desinhibir el efecto de los POEs de origen inmunitario (Figura 6B). Este mecanismo, por el cual se maximiza el potencial analgésico de las células inmunitarias que se acumulan de forma natural in el lugar de la inflamación, es totalmente diferente a la analgesia convencional. Nuestros resultados sugieren que los antagonistas sigma-1 merecen estudios más amplios sobre su potencial para el tratamiento del dolor inflamatorio.

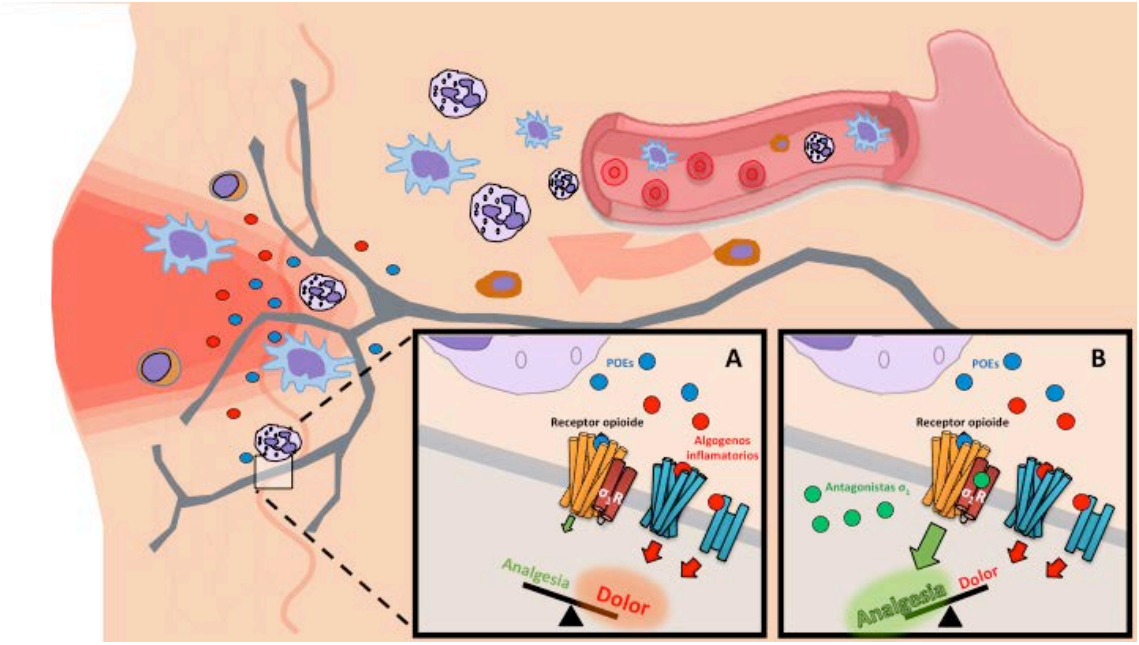


Fig 6. Efecto de los antagonistas sigma-1 sobre la analgesia de origen inmune. Las células inmunitarias migran a la zona inflamada donde interaccionan con las terminales nerviosas periféricas, las cuales expresan ICAM-1. Estas células inmunitarias son capaces de liberar algógenos inflamatorios que producen dolor, pero también liberan péptidos opioides endógenos (POEs). En condiciones normales el resultado general de esta interacción inmune-neurona desemboca en dolor, porque de manera tónica el receptor simga-1 (σ_1R) inhibe los receptores opioides, y por ello disminuye el efecto analgésico de los POEs (A). En presencia de los antagonistas sigma-1, el receptor opioide maximiza su acción potenciándose el efecto de los POEs de origen inmunitario, dando como resultado una analgesia opioide de origen inmunitario (B).

Bibliografía

1. Kissin I (2010) The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. Anesth Analg 110(3):780-789.

2. Su TP, Su TC, Nakamura Y, Tsai SY (2016) The sigma-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. Trends Pharmacol Sci 37(4):262-278.

3. Zamanillo D, Romero L, Merlos M, Vela JM (2013) Sigma 1 receptor: a new therapeutic target for pain. Eur J Pharmacol 716(1-3):78-93.

4. Vela JM, Merlos M, Almansa C (2015) Investigational sigma-1 receptor antagonists for the treatment of pain. Expert Opin Investig Drugs 24(7):883-896.

5. Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. J Pain 10(9):895-926.

6. Abadias M, Escriche M, Vaqué A, Sust M, Encina G (2013) Safety, tolerability and pharmacokinetics of single and multiple doses of a novel sigma-1 receptor antagonist in three randomized phase I studies. Br J Clin Pharmacol 75(1):103-117.

7. Chien CC, Pasternak GW (1993) Functional antagonism of morphine analgesia by (+)-pentazocine: evidence for an anti-opioid sigma 1 system. Eur J Pharmacol 250(1):R7-R8.

8. Mei J, Pasternak GW (2002) Sigma1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. J Pharmacol Exp Ther 300(3):1070-1074.

9. Sánchez-Fernández C et al. (2013) Potentiation of morphine-induced mechanical antinociception by sigma1 receptor inhibition: role of peripheral sigma1 receptors. Neuropharmacology 70:348-358.

10. Sánchez-Fernández C et al. (2014) Modulation of peripheral mu-opioid analgesia by sigma1 receptors. J Pharmacol Exp Ther 348(1):32-45.

11. Mavlyutov TA et al. (2016) Sigma-1 receptor expression in the dorsal root ganglion: Reexamination using a highly specific antibody. Neuroscience 331:148-157.

12. Kim FJ et al. (2010) Sigma 1 receptor modulation of G-protein-coupled receptor signaling: potentiation of opioid transduction independent from receptor binding. Mol Pharmacol 77(4):695-703.

13. Rodríguez-Muñoz M et al. (2015) The sigma1 receptor engages the redox-regulated HINT1 protein to bring opioid analgesia under NMDA receptor negative control. Antioxid Redox Signal 22(10):799-818.

14. Tejada MA et al. (2014) Sigma-1 receptor inhibition reverses acute inflammatory hyperalgesia in mice: role of peripheral sigma-1 receptors. Psychopharmacology (Berl) 231(19):3855-3869.

15. Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ (2014) Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. Nat Rev Drug Discov 13(7):533-548.

16. Hua S, Cabot PJ (2010) Mechanisms of peripheral immune-cell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. Trends Pharmacol Sci 31(9):427-433.

17. Romero L et al. (2012) Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. Br J Pharmacol 166(8):2289-2306.

18. Menéndez L, Lastra A, Meana A, Hidalgo A, Baamonde A (2005) Analgesic effects of loperamide in bone cancer pain in mice. Pharmacol Biochem Behav 81(1):114-121.

19. Rang H-P, Dale M-M, Ritter J-M, Flower R-J (2007) How drugs act: general principles. RANG AND DALE´S Pharmacology, eds Rang H-P, Dale M-M, Ritter J-M, Flower R-J (Churchill Livingstone, Elsevier), pp 8-24.

20. Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendán CM, Del Pozo E (2008) Pharmacology and therapeutic potential of sigma1 receptor ligands. Curr Neuropharmacol 6(4):344-366.

21. Rittner HL et al. (2001) Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. Anesthesiology 95(2):500-508.

22. Rittner HL, Stein C (2005) Involvement of cytokines, chemokines and adhesion molecules in opioid analgesia. Eur J Pain 9(2):109-112.

23. Sahbaie P, Li X, Clark JD (2012) Roles of Gr-1+ leukocytes in postincisional nociceptive sensitization and inflammation. Anesthesiology 117 (3):602-612.30.

24. Wang JX et al. (2012) Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a beta2-integrin-dependent mechanism. Blood 120(7):1489-1498.

25. Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. Nature 413(6852):203-210.

26. Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Baeyens JM (2005) Antinociceptive effects of haloperidol and its metabolites in the formalin test in mice. Psychopharmacology (Berl) 182(4):485-493.

27. Entrena JM et al. (2009) Antagonism by haloperidol and its metabolites of mechanical hypersensitivity induced by intraplantar capsaicin in mice: role of sigma-1 receptors. Psychopharmacology (Berl) 205(1):21-33.

Capítulo 13

Modificaciones de la memoria asociadas a la edad: el caso de los "super-ancianos"

Gómez Chacón B, Gallo M.

Resumen

El envejecimiento, incluso en ausencia de enfermedades neurodegenerativas con la enfermedad de alzheimer (ea), está frecuentemente acompañado de un declive de la memoria que afecta selectivamente a la memoria declarativa. dicho declive se corresponde con alteraciones en la organización anatómica y funcional del hipocampo así como áreas corticales temporales y prefrontales interconectadas. las modificaciones de los patrones de activación cerebral, que incluyen mayor número de áreas activadas y reducida lateralización, suelen ser interpretados en términos de compensación. se propone una interpretación alternativa como resultado adaptativo de los efectos acumulativos de la experiencia a lo largo de la vida gracias a procesos de aprendizaje y memoria.

El caso de los super-ancianos demuestra que el declive cognitivo no es inevitable y que es posible mantener una excelente capacidad de memoria a edades avanzadas. Se discuten los factores que pueden contribuir al envejecimiento cognitivo satisfactorio saludable.

Envejecimiento: una etapa normal del desarrollo que requiere una explicación multifactorial

Según las perspectivas demográficas, en los últimos años el número de personas mayores de 60 años irá aumentando considerablemente frente a otros grupos de edad (1). Este aumento es debido a una mayor esperanza de vida y a la disminución de la natalidad lo que da lugar a lo que se conoce como “envejecimiento poblacional”. La estimación de un mayor envejecimiento poblacional en los próximos años, y la relevancia social de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad avanzada, tal como la enfermedad de Alzheimer, ha aumentado el interés por la investigación del efecto del envejecimiento sobre las funciones cognitivas ya que de su preservación depende la calidad de vida y autonomía a edades avanzadas.

El envejecimiento es un proceso normal del desarrollo que ocurre al final de nuestra etapa vital y afecta a todos los seres vivos. Se describe como un conjunto de cambios morfológicos, funcionales y psicológicos que conlleva modificaciones en la estructura y función de los diferentes sistemas, aumentando la susceptibilidad a una variedad de patologías tales como cáncer, trastornos inmunológicos, cataratas, diabetes, hipertensión, insuficiencia renal, trastornos neurodegenerativos, etc. (2). En términos cronológicos, aunque depende de aspectos culturales, existe acuerdo en situar el comienzo del envejecimiento en los 60-65 años de edad. El periodo que se extiende hasta la muerte puede alcanzar alrededor de 40 años de vida y, por ello, se han propuesto clasificaciones que incluyen tres fases: vejez temprana (60-65 hasta 75), media (75-85) y tardía (más de 85-90).

La causa o causas del envejecimiento no son bien conocidas. Se dedican grandes esfuerzos a buscarla respuesta desde numerosos campos de investigación. Ello ha traído consigo una diversidad de teorías basadas en el deterioro de sistemas o aspectos específicos. Según las teorías genéticas, el envejecimiento podría ser el resultado del cumplimiento de un estricto programa genético, de alteraciones fortuitas del ADN y/o enzimas indispensables para la vida. Las teorías que se centran en alteraciones hormonales hacen hincapié bien en cambios del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (3) bien del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. Existen propuestas centradas en el declive del sistema inmunitario. Por su parte, la teoría

oxidativa enfatiza el efecto destructivo acumulativo de los radicales libres de oxígeno producto del metabolismo oxidativo como responsable de la degradación de la maquinaria metabólica celular y la aparición de lesiones en las células y los tejidos. Se trata, por tanto, de un campo que requiere amplias investigaciones antes de atisbar una explicación completa. La variedad de teorías nos da una idea de que el envejecimiento es un proceso multifactorial, además de ser continuo e inevitable.

Es de destacar que todas las teorías parten de una concepción del envejecimiento exclusivamente en términos de deterioro y decaimiento de las funciones. Sin embargo, no todas las personas envejecen de la misma forma y el decaimiento no afecta por igual a todos los órganos y funciones en todos los individuos. Efectivamente una característica del envejecimiento es la gran variabilidad intra y entre individuos. Determinadas funciones sufren decaimiento mientras que otras pueden resultar preservadas e incluso mejoradas. Las diferencias individuales se atribuyen en gran medida a que el envejecimiento se ve influenciado no solo por factores internos sino también por factores externos ambientales que dependen del estilo de vida y a que ambos interaccionan a lo largo de varias décadas de historia personal. Una de las mayores dificultades para el estudio del envejecimiento como proceso normal de desarrollo viene dada por la dificultad en disociar los efectos de la edad de los producidos por condiciones patológicas. Esta disociación es especialmente difícil en el caso de las alteraciones cognitivas asociadas al envejecimiento considerado “normal” que no difieren de las manifestaciones tempranas de la enfermedad de Alzheimer. En este capítulo se revisan los conocimientos sobre los cambios cognitivos que tienen lugar durante el envejecimiento y los factores que los determinan, con especial interés en la memoria.

Memoria y envejecimiento: modificaciones que no implican necesariamente decaimiento.

Durante el envejecimiento se describen cambios cognitivos dentro de un rango considerado propio de un envejecimiento denominado normal, normativo o fisiológico a diferencia del envejecimiento patológico asociado a trastornos neurodegenerativos. De forma general, se acepta que el rendimiento cognitivo disminuye de forma progresiva desde la vida adulta en una variedad de funciones.

Sin embargo, no todas las funciones cognitivas disminuyen de la misma manera y existe una amplia variabilidad entre individuos. Incluso esta variabilidad puede ser mayor durante la vejez, tal y como exponen los autores Gallagher y Rapp (4), como consecuencia de la acumulación de diferencias biológicas y de las experiencias vividas. La distinción entre inteligencia fluida y cristalizada, desarrollada en la teoría de Raymond Cattell a partir de la propuesta de Donald Hebb (5), permite disociar funciones cognitivas más vulnerables al envejecimiento frente a las que suelen resultar preservadas y se benefician de la experiencia vivida. La inteligencia fluida se refiere a la capacidad de razonamiento, síntesis y resolución de problemas independiente del conocimiento adquirido, mientras que la inteligencia cristalizada se refiere a la capacidad de aplicar el conocimiento, información o habilidades adquiridas a través de la experiencia. La primera se evalúa generalmente en pruebas no verbales y la segunda en pruebas de vocabulario y conocimientos generales. Aunque es frecuente considerar a la fluida superior en términos de inteligencia, en palabras de Donald Hebb “*el contraste no radica entre inteligencia* (fluida) *y conocimiento* (cristalizada)*, sino entre la capacidad de desarrollar nuevos patrones de respuesta y el funcionamiento de aquellos ya desarrollados*” (6). Es concebible pensar que a medida que se acumula la experiencia la inteligencia cristalizada adquiera una mayor relevancia en el control del comportamiento. De acuerdo con ello, se ha descrito un decaimiento selectivo de la inteligencia fluida durante el envejecimiento que se ha relacionado con deterioro cerebral estructural y/o funcional (7), sin que resulte afectada la inteligencia cristalizada.

Un planteamiento similar puede aplicarse a las modificaciones de las capacidades de memoria. Aunque los recuerdos antiguos, bien consolidados no suelen estar afectados, los problemas de memoria representan uno de los rasgos más frecuentes en los ancianos humanos no afectados por trastornos neurodegenerativos. Afectan al 50% de la población de mayores de 65 años y suelen ser el primer signo más común en caracterizar tanto al envejecimiento normal como a las primeras etapas de la enfermedad del Alzheimer. Es la fase de adquisición de una nueva memoria, es decir, la capacidad de codificar una nueva información, lo que suele disminuir a lo largo de la vida (8). También se han descrito dificultades en la recuperación de la memoria (8), que se define como la

capacidad de acceder a esa información. Por el contrario, la retención de una información aprendida con éxito, se conserva en adultos sanos (9). Ello implica que no resulta afectado el almacenamiento de la información como tal, sino que el proceso de recuperación, monitorización y verificación de la información. Sin embargo, no todos los tipos de memoria se deterioran con la misma intensidad durante este proceso (10-13).

Según Squire (13, 14) la memoria a largo plazo se divide en memoria declarativa y no declarativa (figura 1), dicotomía que se corresponde en cierto modo con otras, como la propuesta por Schacter (11) entre memoria explícita versus memoria implícita.

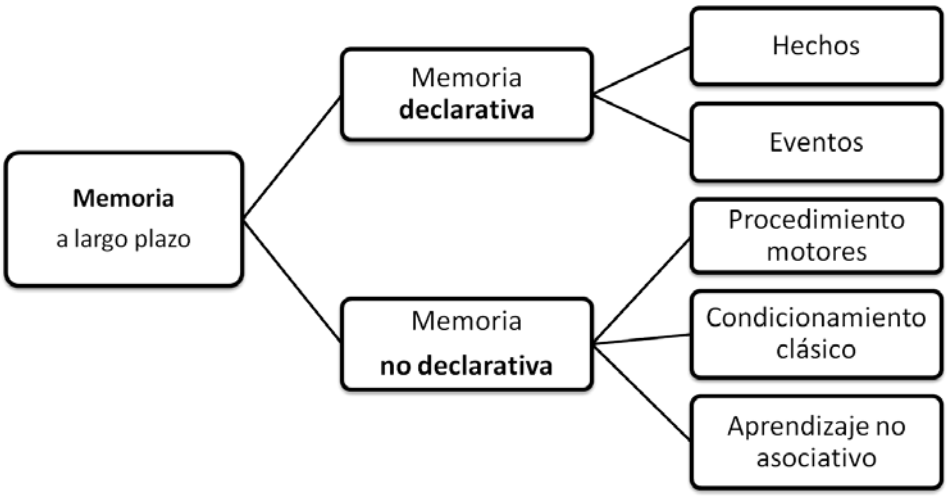


Fig 1. Clasificación de los sistemas de memoria de largo plazo en mamíferos (adaptado de Squire, 2004).

La memoria declarativa, también denominada memoria relacional, permite la recuperación consciente de información referente a hechos y experiencias vividas y contiene información interconectada de diversas modalidades sensoriales así como del contexto exteroceptivo (espacial, temporal) e interoceptivo (emocional, motivacional). La memoria declarativa requiere la integridad del llamado sistema temporal, que incluye hipocampo y otras áreas temporales mediales así como prefrontales. Es el tipo de memoria que resulta selectivamente afectada en pacientes amnésicos. A su vez la memoria declarativa puede clasificarse como memoria semántica (uso del lenguaje, significado de palabras, conceptos…) o memoria episódica (eventos y sucesos personales que ocurren en un lugar y tiempo determinado). Es ésta última en la que se ha observado un declive gradual

durante toda la vida del sujeto (15) mientras que la semántica, sobre todo el aspecto léxico-semántico y el razonamiento verbal, no solo se preserva sino que puede mejorar con la edad (16).

Por otro lado, el término memoria no declarativa se refiere a la modificación del comportamiento por los efectos de la experiencia sin que el individuo sea consciente de ello. Se produce como resultado de procesos de aprendizaje no conscientes de diversa naturaleza (hábitos, aprendizaje perceptivo, efectos de primacía y formas simples de condicionamiento asociativo y no asociativo). Por ello depende de una variedad de circuitos neurales disociables (amígdala, ganglios de la base, áreas corticales sensoriales). A diferencia de la memoria declarativa, esta memoria no suele sufrir cambios con la edad y se ha descrito que permanece estable a lo largo de la vida (16).

Función cerebral, Memoria y envejecimiento.

Las técnicas de neuroimagen funcional son hoy en día una herramienta fundamental en investigación ya que permiten establecer comparaciones entre la activación de los circuitos funcionales de adultos y ancianos mientras realizan tareas cognitivas. Una de las principales áreas cerebrales objeto de estudio es la corteza prefrontal. La corteza prefrontal mantiene conexiones importantes con otras áreas corticales y subcorticales y está especialmente interconectada con regiones temporales implicadas en los procesos de memoria. También se ha visto que durante el envejecimiento pueden aparecen síntomas característicos de pacientes con lesiones prefrontales, tales como perseverancia, impulsividad, etc. Los pacientes con daño en la corteza frontal padecen una pérdida no generalizada de la memoria. En estos pacientes, la información se recuerda correctamente pero el contexto espacio-temporal en el que se adquirió dicha información queda olvidado (17). Junto a la correlación encontrada entre el deterioro del procesamiento de la información contextual y la activación anormal de la corteza prefrontal se ha puesto en evidencia la participación del hipocampo en este circuito.

Grady y colaboradores (18) midieron el flujo sanguíneo durante una tarea de codificación y reconocimiento de rostros. Encontraron que el grupo de ancianos sanos tenían menor puntuación en la tarea frente al grupo de jóvenes y que ello

estaba asociado con una reducción en la activación cortical prefrontal e hipocampal. Otros autores encuentran una activación equivalente del hipocampo cuando se comparan los resultados obtenidos por jóvenes y ancianos, y señalan a otras áreas del lóbulo temporal medial como responsables de la deficiencia encontrada en el grupo de ancianos frente al de los jóvenes. En conjunto, todos los resultados apoyan la vulnerabilidad selectiva a los efectos del envejecimiento del sistema hipocampal que incluye áreas hipocampales y parahipocampales temporales así como áreas prefrontales.

Otro de los aspectos que han reflejado las técnicas de neuroimagen funcional es que los ancianos tienden a activar más áreas cerebrales frente a los jóvenes a la hora de realizar las mismas tareas. Ello no puede atribuirse a una mayor dificultad por parte de los ancianos en las tareas de memoria ya que se han descrito patrones de activación diferentes en la corteza prefrontal entre jóvenes y ancianos durante la recuperación sin éxito en ambos grupos. Incluso en el caso de personas mayores que muestran una ejecución similar a la de adultos jóvenes en tareas de memoria episódica espaciales y verbales son característicos patrones de activación cerebral peculiares con activación de mayor número de áreas corticales.

Además, se ha observado el uso de ambos hemisferios para realizar tareas que solo inducen activación unilateral en adultos más jóvenes (18). El modelo HAROLD (Hemispheric Asymmetry Reduction in Old Adults) propone que la actividad de la corteza prefrontal en el envejecimiento aparece menos lateralizada que en los jóvenes, aspecto que puede corresponderse con una función de tipo compensatoria o indicar un proceso de diferenciación con respecto a los cerebros de personas jóvenes (19).

Los resultados obtenidos con modelos animales en roedores que no padecen enfermedad de Alzheimer han confirmado que, cuando se produce, el deterioro de memoria asociado al envejecimiento es selectivo a la ejecución de tareas sensibles al daño del sistema temporal. Asimismo, se han descrito patrones de activación alterados en áreas temporales, tales como la corteza perirhinal (19). Estos resultados muestran que puede existir un declive cognitivo debido a la edad independiente de la aparición de procesos neuropatológicos, y que dicho declive parece asociado a cambios en el sistema temporal.

Alteraciones en la función cerebral soportan la memoria durante el envejecimiento.

Otros aspectos importantes que se han estudiado durante el envejecimiento son los cambios neurobiológicos que conllevan variaciones en la morfología del cerebro. En conjunto, los estudios de neuroimagen estructural por resonancia magnética (MRI) han puesto de manifiesto una disminución del volumen cortical en ancianos. Esta disminución de volumen va acompañada de un ensanchamiento de los surcos y una disminución de las circunvoluciones cerebrales. Se ha descrito disminución del número de neuronas y de las sinapsis en áreas cerebrales como el lóbulo prefrontal, los ganglios basales o el cerebelo (20). La reducción del número de neuronas no sigue un patrón generalizado en el cerebro, sino que es diferente en función del sexo y del área cerebral. En los hombres, se ha descrito pérdida mayor en los lóbulos frontales y temporales, mientras que en las mujeres en el hipocampo y en los lóbulos parietales (21).

Los problemas de memoria de los ancianos fueron inicialmente relacionados con la pérdida de neuronas hipocampales descrita en los estudios tempranos con tejido obtenido de autopsias. Sin embargo, posteriormente se ha comprobado que los resultados obtenidos en aquellos estudios estaban afectados por problemas metodológicos ya que el envejecimiento altera el modo en que se contrae el tejido en respuesta al tratamiento histológico. Estudios posteriores empleando estereología han demostrado preservación del número de neuronas hipocampales en humanos, monos, ratas y ratones (22). Aunque puede existir cierta pérdida de neuronas descrita en estudios aislados, ello no afecta a las células granulares del giro dentado ni a los principales tipos neuronales del hipocampo. Tampoco se han encontrado alteraciones relevantes de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas hipocampales, tales como potencial de membrana en reposo, en respuesta a estímulos o potenciales postsinápticos graduados, etc.., que puedan ser el sustrato de los problemas de memoria (22).

Dado que el envejecimiento no parece alterar ni el número ni las propiedades basales de las neuronas hipocampales, se ha propuesto la alteración en la función sináptica como responsable de los problemas de memoria asociados a edades avanzadas. De acuerdo con ello, en ratas se ha descrito reducción del número de sinapsis en el giro dentado. Esta reducción se corresponde con un mayor efecto de

la estimulación en cada sinapsis, de manera que se induce potenciales postsinápticos de mayor amplitud en neuronas envejecidas en comparación con adultas más jóvenes siendo equivalentes las condiciones de estimulación de las fibras aferentes (22). Asimismo, se han descrito en otras regiones hipocampales cambios en la fuerza de las sinapsis, liberación de neurotransmisores y número de receptores, así como alteraciones de los mecanismos intracelulares responsables de la plasticidad hipocampal (deterioro de LTP e incremento de LTD).

En resumen, podríamos localizar los cambios estructurales más significativos durante el envejecimiento en la corteza cerebral, mientras que la formación hipocampal parece sufrir predominantemente alteraciones funcionales. A continuación se enumeran las principales alteraciones morfológicas descritas (Figura 2):

- **Atrofia cortical.** La corteza cerebral parece experimentar un deterioro progresivo durante nuestro ciclo vital hasta alcanzar la edad de los 53 años donde la tasa de deterioro se vuelve más abrupta. Dentro de la corteza, diferentes estudios afirman que la corteza frontal parece contar con una mayor tasa de atrofia junto con la corteza parietal.

- **Sustancia Blanca.** La sustancia blanca también sufre cierto deterioro durante el envejecimiento normal, encontrándose deterioro volumétrico dependiente de la región. Este deterioro parece ser mayor en las regiones frontales.

- **Sistema ventricular.** Se ha descrito una dilatación de los ventrículos como consecuencia de la pérdida del tejido cerebral.

- **Cambios en la actividad metabólica y neuroquímica.** Estudios metabólicos y de flujo sanguíneo han encontrado una disminución de la actividad frontal en ancianos. También se ha detectado una mayor tasa de degradación de neurotransmisores en este grupo, como la dopamina.

Plasticidad neuronal y envejecimiento

La plasticidad se define como la capacidad del cerebro de adaptar su estructura y función a los cambios del ambiente, incluyendo ambiente interno o externo, experiencia previa o lesiones (23). Se trata de una propiedad intrínseca del sistema nervioso en todos sus niveles de organización desde el molecular y celular hasta el de sistemas, que aparece en todas las áreas cerebrales y que se mantiene a lo largo de toda la vida. La importancia de este concepto en el campo del envejecimiento radica en dos ámbitos diferentes.

Por un lado, las propiedades plásticas del sistema nervioso pueden explicar la naturaleza de las modificaciones en el cerebro y el comportamiento asociadas al envejecimiento. En ausencia de patologías, el envejecimiento representa el resultado de los efectos de la plasticidad dependiente de la experiencia durante una larga vida. Puesto que los efectos son acumulativos, es al final de la vida cuando se hacen patentes y adquieren especial magnitud pequeñas diferencias individuales que tuvieron lugar en etapas tempranas de la plasticidad implicada en la formación del sistema nervioso a las que se fueron sumando los efectos de la plasticidad dependiente de la experiencia que siguen produciendo adaptaciones a los cambios del entorno durante toda la vida. Dado que la edad avanzada va asociada a un riesgo incrementado de padecer no solo neuropatologías sino diversas enfermedades del organismo en general, es frecuente que la propia percepción del entorno se vea modificada por deterioro de las funciones sensoriales (visión, oído, olfato), motoras y de otros sistemas fisiológicos. Las propiedades plásticas del cerebro envejecido permiten la adaptación a las nuevas condiciones impuestas por las patologías. En ocasiones, la reorganización de los circuitos cerebrales inducida por daño cerebral o procesos neurodegenerativos puede añadirse a las alteraciones inducidas de forma primaria por la edad y la experiencia acumulada, colaborando en la aparición de anomalías cognitivas.

Por otro lado, la preservación de la plasticidad neural durante toda la vida abre nuevas posibilidades para prevenir el deterioro funcional o paliarlo en la medida de lo posible una vez que se ha producido. En este sentido, un concepto a tener en cuenta a la hora de tratar el envejecimiento es la llamada “reserva cognitiva”. Este término fue definido por Stern (24) como la capacidad que tiene el cerebro para resistir la expresión de los síntomas, en el caso de producirse cambios

neuropatológicos. Es decir, no existe una relación directa entre el grado de patología cerebral y los síntomas clínicos (24) ya que el cerebro poseería un efecto protector frente al deterioro cognitivo. La hipótesis de la reserva cognitiva asume que este es un proceso dinámico que puede ir modificándose a lo largo de la vida por distintas variables como la inteligencia innata y el estilo de vida (la dieta, actividades cognitivamente estimulantes, educación…). Este concepto no solo tiene una gran relevancia en el envejecimiento normal sino también en el envejecimiento que cursa de forma patológica.

- **Las características de la peculiar organización cerebral anatomo-funcional durante el envejecimiento como resultado de la plasticidad a lo largo de la vida.**

Como hemos visto en apartados anteriores, el envejecimiento se ha relacionado con un declive en varias funciones cognitivas. Este declive no se produce por igual en todas las funciones ni tiene que seguir el mismo patrón en distintos individuos. Los estudios comportamentales muestran el cambio de estrategia que siguen los ancianos frente a los jóvenes a la hora de realizar las mismas tareas cognitivas. Ello es evidente en tareas de memoria en las que pueden mostrar deterioro cuando participa la memoria episódica consciente mientras que la memoria no declarativa que modifica el comportamiento de un modo "automático", no consciente, se mantiene preservada y en muchas ocasiones facilitada. Dichos cambios pueden inducir mayor número de errores en ancianos cuando se requiere flexibilidad, es decir, cambios en la respuesta dependiendo de las exigencias de la tarea (inteligencia fluida). La interpretación más extendida de la ejecución a edades avanzadas en tareas cognitivas hace hincapié en la decadencia de la memoria declarativa y de la inteligencia fluida asociada. Sin embargo, se puede proponer una interpretación alternativa basada en el aumento del peso de la memoria no declarativa y la inteligencia cristalizada asociada a medida que se acumulan los efectos de la experiencia. En el primer caso, la facilitación de la memoria no declarativa se interpreta como compensación del deterioro de la memoria declarativa, mientras que en el segundo caso se contempla como el desarrollo de una función más adaptativa y eficaz por parte de la memoria no declarativa que domina a edades avanzadas dadas las condiciones de las últimas etapas de la vida.

Sea cual sea la edad, las conductas complejas, cuando se realizan por primera vez, requieren atención consciente, son lentas y exigen muchos recursos cognitivos impidiendo que se lleven a cabo otras tareas en paralelo. La práctica y experiencia repetida permite que esas conductas se automaticen, no requiriendo procesamiento consciente y permitiendo realizar otras tareas simultáneas al liberar recursos cognitivos. Se trata de una disociación entre conductas automáticas versus controladas. Un claro ejemplo es adquirir habilidades motoras tales como aprender a conducir un vehículo, andar en bicicleta, etc. Las primeras veces, aunque se hayan recibido lecciones teóricas acerca de la naturaleza de la tarea, de las reglas y del vehículo, son tareas difíciles, que requieren memoria y atención consciente, se llevan a cabo con torpeza, se ejecutan con errores y no permiten realizar otras tareas al mismo tiempo. Sin embargo, la práctica repetida permite la participación de procesos de aprendizaje y memoria inconscientes que automatizan las tareas, convirtiéndolas en fáciles, de modo que la misma tarea se ejecuta con rapidez, precisión y eficacia mientras que pueden llevarse a cabo otras tareas complejas simultáneamente, como por ejemplo mantener una conversación compleja. La condición para que las tareas se automaticen es la práctica repetida, es decir, la experiencia. Por ello, no es de extrañar que a medida que pasan los años la ejecución de todas las tareas que se llevan a cabo se automatice. Ello parece especialmente adaptativo para facilitar la vida de un organismo de edad avanzada. En ausencia de cambios drásticos en el ambiente, después de una larga vida no es probable que el anciano se encuentre con situaciones totalmente novedosas, por lo que la memoria no declarativa le permite responder eficazmente a las necesidades que esta etapa de la vida impone. La mayor parte de los nuevos retos a los que el anciano debe enfrentarse están relacionados con las modificaciones en la estructura y función del organismo asociadas en muchos casos a enfermedades y degeneración. Por ello, no suele estar en las mejores condiciones para emplear estrategias nuevas, que le coloquen en situaciones de indefensión al actuar con torpeza y lentitud. Es más eficaz explotar los recursos adquiridos con la práctica repetida a lo largo de su vida de manera que la memoria no declarativa y los procesos no conscientes se impongan en el control del comportamiento, aunque sea a costa de cometer errores cuando la situación exija la participación de la memoria declarativa y flexibilidad.

Esta interpretación de los cambios cognitivos asociados al envejecimiento explica las alteraciones en los patrones de activación cerebral descritos en seres humanos y animales de edades avanzadas (apartado 3) así como los correspondientes cambios estructurales (apartado 4). La reducción del empleo de la memoria declarativa se corresponde con el decaimiento funcional del sistema hipocampal que incluye el hipocampo y áreas corticales temporales así como sus conexiones con la corteza prefrontal, mientras que el predominio de la memoria no declarativa depende de la preservación de los circuitos predominantemente subcorticales.

Asimismo, otra consecuencia de la plasticidad asociada al aprendizaje y la memoria es que a lo largo de la vida se hayan establecido y reforzado redes complejas de conexiones entre los estímulos experimentados. Ello es coherente con el patrón de activación cerebral característico del anciano frente al de adulto joven descrito en los estudios de neuroimagen. Los ancianos tienden a emplear más áreas cerebrales para realizar la misma tarea cognitiva. Además, se ha observado el uso de ambos hemisferios para realizar tareas unilaterales (18). Efectivamente, los ancianos emplean estrategias conductuales diferentes y por tanto circuitos distintos para la realización de tareas cognitivas. Esta interpretación difiere de la más generalizada que explica estos cambios como compensatorios por el decaimiento de los circuitos responsables de la memoria declarativa. En definitiva, proponemos que las alteraciones en la función cerebral relacionadas con la edad reflejan una combinación de complejos procesos plásticos que van más allá de mero decaimiento de la funciones de memoria y representan una adaptación eficaz a las condiciones ambientales.

- **La naturaleza de la experiencia vivida como origen de las diferencias individuales durante el envejecimiento.**

Lo que se desprende de lo discutido hasta ahora es que el cerebro de las personas mayores, pese a ser un cerebro envejecido, realiza funciones de reorganización, compensación y aprovechamiento de la plasticidad cerebral que le permiten adaptarse a los cambios del entorno. Estas capacidades plásticas pueden explicar las diferencias individuales en respuesta a las patologías neurodegenerativas asociadas a edades avanzadas. En este sentido la teoría de la

reserva cerebral defiende que los cambios funcionales asociados a la edad reflejan mecanismos plásticos de compensación de defectos anatomo-funcionales asociados a la edad. Dependiendo de las características del entorno y del estilo de vida, estos cambios plásticos pueden ser beneficiosos o perjudiciales al llegar a edades avanzadas. Esta plasticidad neuronal supone un papel importante en el tratamiento del déficit cognitivo localizado, tanto en el envejecimiento normal como en las enfermedades neurodegenerativas (25). Además, permite entender el envejecimiento como una etapa en la que se pueden mantener niveles adecuados de destrezas físicas y cognitivas dando lugar a un envejecimiento satisfactorio.

El enriquecimiento ambiental es un modelo que permite estudiar en animales de laboratorio el efecto de la variabilidad en la experiencia vivida sobre los cambios plásticos que ocurren en el cerebro gracias a la estimulación sensorial y social. Estos cambios cerebrales mediados por la interacción entre el organismo y su entorno se han demostrado no solo en animales de laboratorio sino también en humanos.

En roedores, varios estudios usando un ambiente enriquecido, han demostrado cambios en los niveles celular, molecular y conductual (26, 27). El efecto positivo del ambiente hizo mejorar el aprendizaje y la memoria, la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, el grosor cortical, el tamaño de los contactos sinápticos, así como la ramificación dendrítica y la formación de nuevas sinapsis en varias áreas cerebrales como la corteza cerebral y los ganglios basales (27–33). También se ha demostrado que el enriquecimiento ambiental produce cambios en varios sistemas de neurotransmisores (34, 35). Asimismo se ha descrito que el efecto positivo de este ambiente atenúa los cambios relacionados con la edad como el grosor cortical (33, 36, 37), ramificación dendrítica (33, 37), densidad de espinas (31, 33), neurogénesis (35, 38, 39) y la gliogénesis (40). Todos estos efectos se han correlacionado con un mejor rendimiento de los animales envejecidos en diferentes tareas de aprendizaje (38, 40–42). Por lo tanto, el cerebro envejecido parece responder al enriquecimiento ambiental. Se ha observado que incluso los efectos positivos que provoca la actividad física y mental sobre las diferentes funciones neurocognitivas en los ancianos, hacen que las personas sean más resistentes al Alzheimer (37, 43, 44).

Todos estos datos han proporcionado una nueva perspectiva sobre la modulación de los mecanismos de la plasticidad dependiente del entorno, que incluye la neurogénesis y el aumento de la densidad sináptica y su importancia en el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas (27, 45, 46).

Un cerebro envejecido muestra declive funcional y muerte celular. En él se producen cambios tanto cuantitativos como cualitativos en número de neuronas, densidad sináptica, cantidad de neurotransmisores, etc. Estos cambios que se localizan mayoritariamente en corteza e hipocampo pueden ser los responsables de degradar la plasticidad y la disfunción neuronal general (35, 47–49), contribuyendo al deterioro funcional observado en el envejecimiento (45). Sin embargo, los resultados de diversas investigaciones demuestran que la plasticidad sigue teniendo lugar durante el envejecimiento. Una interacción entre los efectos negativos del envejecimiento contrarrestados con los efectos positivos de la plasticidad facilitada por el enriquecimiento del entorno podría llevar a una restauración del comportamiento cognitivo. Un ejemplo de ello es que, tras la pérdida de neuronas aferentes, se localizan una mayor cantidad de receptores postsinápticos de afinidad incrementada, muy parecido a lo que ocurre tras la administración de fármacos antagonistas (50). Este podría ser el caso de los circuitos neuronales en la corteza cerebral y el hipocampo, circuitos cuyas funciones complejas han demostrado ser particularmente vulnerables al envejecimiento (51).

Diferentes autores también han asociado esa plasticidad con la dependencia de su uso. Se ha hipotetizado que si un sujeto posee a lo largo de su vida estrategias dirigidas a potenciar la plasticidad podría mejorar las condiciones de envejecimiento. Esto nos abre la posibilidad de contrarrestar el declive del envejecimiento, frente a los autores que opinan que esta degeneración es inevitable.

Factores que favorecen el envejecimiento cognitivo satisfactorio

Diferentes factores parecen intervenir como protectores y facilitadores en el desarrollo de un envejecimiento saludable. Gracias a todos los estudios en el campo del envejecimiento se han podido identificar distintos factores que facilitan la preservación de las funciones cognitivas, consiguiendo mejorar la calidad de

vida durante el envejecimiento. El efecto de estos factores se interpreta en el sentido de mejorar las estrategias cognitivas compensatorias dando lugar a un envejecimiento satisfactorio.

Entre los factores más relevantes para el envejecimiento satisfactorio merecen mención los siguientes:

- **Padecer enfermedades**

Varios estudios han demostrado que la ausencia de padecer enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas actúa como factor que reduce el riesgo de declive cognitivo en edades avanzadas (52), sin darse una relación causal entre ambas variables. También se ha relacionado un mejor rendimiento cognitivo en edades avanzadas con fumar menos y hacer más ejercicio por las implicaciones directas sobre el sistema cardiovascular. En este sentido, la presión arterial elevada se ha correlacionado con peor ejecución en tareas cognitivas y peor funcionamiento cognitivo cuando se realiza un seguimiento transcurridos 20 años (53).

- **Dieta**

De acuerdo con la teoría oxidativa, el mantenimiento de una dieta equilibrada, junto con un alto consumo de antioxidantes (especialmente b-carotenos) en nuestra dieta pueden protegernos frente al estrés oxidativo y como consecuencia al deterioro cognitivo asociado a la edad (54).

- **Ejercicio**

Hacer ejercicio se aconseja tanto para tener una buena salud mental como un mejor funcionamiento cognitivo. Estudios con ratas han demostrado mayores niveles de BDNF, factor neurotrófico que posibilita nuevas conexiones y mejora el funcionamiento cerebral, en el hipocampo en respuesta al ejercicio físico (55, 56). El desarrollo de una actividad física moderada y continuada en el tiempo está asociada con una reducción de la inflamación y de pérdida de tejido cerebral (57).

- **Educación**

El nivel educativo se ha asociado a un incremento en la capacidad de neurogénesis y mejora en la eficiencia y flexibilidad de las redes neuronales (58).

Así como el mantenimiento de una estimulación cognitiva continua, ha sido considerada como facilitadora de la neuroplasticidad (59).

- **Estrés**

La acumulación de estrés es uno de los factores que recibe especial atención ya que por sí solo produce daño neurobiológico, habiéndose propuesto sus efectos acumulativos como una de las causas del deterioro cognitivo observado en el envejecimiento (60). Diferentes estudios transversales y longitudinales han destacado el importante papel que juega el estrés en el desarrollo de un envejecimiento patológico y, sobre todo, su asociación con el deterioro cognitivo (61). Efectivamente, el hipocampo y la corteza prefrontal son especialmente vulnerables ya que juegan un papel fundamental en la activación y control de la respuesta del estrés ya que una gran densidad de receptores de cortisol (62). Varios estudios han explicado el deterioro asociado a la edad por una regulación a la baja de los receptores del cortisol que provocaría una hipersecreción de cortisol llevando a una toxicidad neuronal, reflejándose en un deterioro de la memoria.

El envejecimiento no necesariamente induce deterioro cognitivo: el caso de los "Super-ancianos"

Son diversos los estudios dirigidos a investigar las características de personas excepcionalmente longevas a fin de identificar posibles factores críticos que permitan entender las claves del envejecimiento. Además de estudios realizados en la población general, se han evaluado especialmente poblaciones con elevado número de centenarios, tales como el Okinawa Centenarian Study o los llevados a cabo por el Institute for Aging Research en el Albert Einstein College of Medecine en Nueva York con judíos Ashkenazi con historias familiares de longevidad (63). Todos los estudios coinciden en atribuir la longevidad a una serie de factores ya mencionados en el apartado anterior (dieta, ejercicio, ausencia de estrés). La longevidad excepcional suele estar asociada al denominado envejecimiento saludable o exitoso, es decir se trata de ancianos capaces de llegar a edades avanzadas sin sufrir el deterioro cognitivo ni las enfermedades que suelen ir asociadas al envejecimiento. El foco de la investigación ha variado en función de las teorías que dirigen los estudios y de las variables consideradas críticas, pero en todos los casos la definición de la población empleada ha sido ambigua. Distintos

autores definen lo que puede considerarse un envejecimiento exitoso incluyendo distintas variables y con distintos umbrales. Así se puede hacer hincapié en la ejecución cognitiva, ausencia de trastornos neurodegenerativos o de otras enfermedades, cardiovasculares, musculares, renales, etc.

El hecho de que el declive cognitivo y de la memoria no es inevitable se demuestra por la existencia de ancianos que mantienen la capacidad de memoria intacta. Como hemos visto en secciones anteriores, la edad se acompaña con cambios en las habilidades cognitivas, especialmente en aquellas relacionados con la memoria declarativa episódica. Sin embargo, hay personas que no experimentan un declive en la memoria a medida que envejecen y son comparables con cohortes más jóvenes. Estas personas son conocidas como “superagers”, término que puede traducirse como “super-ancianos” (64–67). El término en su sentido más estricto es acuñado en el Northwestern SuperAging Project de la Universidad Feinberg en Chicago. Una gran aportación es la definición operacional por su precisión y por estar centrada en la memoria episódica. Así, el grupo de *super-ancianos* se define como aquellas personas de 80 años o más cuyo rendimiento de memoria episódica está, al menos, al mismo nivel de las personas de edades comprendidas entre 50 y 60 años (65). El objetivo del Programa de investigación *Northwestern Superaging Project* es explorar los factores biológicos, psicosociales, genéticos y neuropatológicos que pueden afectar a la memoria episódica en personas con edad avanzada. Se trata de un pequeño grupo de personas mayores cognitivamente normales que parecen resistir la patología del Alzheimer. Este grupo de personas son capaces de realizar tareas cognitivas a un nivel similar a los adultos de mediana edad (64–67) y, a veces, incluso al de adultos jóvenes (68).

Los estudios inicialmente se han centrado en analizar las diferencias anatómicas y funcionales que podrían hacer que este grupo sea tan especial, en comparación con un grupo control de personas con la misma edad. En conjunto, estudios de RM transversales y longitudinales han mostrado que los *super-ancianos* tienen una mejor integridad cortical (64, 65) una corteza cingulada anterior más gruesa (64, 65) y una tasa de atrofia cortical inferior a sus controles con un estado cognitivo promedio (69). A continuación se describen los tres componentes comunes (Figura 2):

- **Grosor cortical**

La morfometría cortical de los *super-ancianos* no se corresponde con la atrofia típica relacionada con la edad. Difiere en comparación con dos grupos de referencia cognitivamente normales: controles de ancianos y de mediana edad (64). Los estudios que han empleado RMI indican que el grosor cortical en la corteza cingulada anterior se conserva en este grupo con capacidades de rendimiento de memoria iguales o mejores que las personas 20-30 años más jóvenes (50 a 65 años) (64).

La atrofia relacionada con la edad es particularmente prominente en la corteza frontoparietal, como en las cortezas parietales lateral y medial prefrontal y lateral, así como porciones de la corteza cingulada y el lóbulo temporal medio (70, 71). La corteza cerebral de los *super-ancianos* era más gruesa que la de un adulto mayor típico y era anatómicamente indistinguible de los adultos jóvenes. El volumen del hipocampo también se conservó y el grosor medio del cíngulo fue más alto en *super-ancianos* en comparación con el grupo de control medio (64, 67). El grosor de varias regiones, incluida la corteza temporal anterior, la corteza prefrontal medial rostral y la corteza antagónica del tercio medio, se correlacionaba con el rendimiento de la memoria, al igual que el volumen del hipocampo (64, 65).

- **Marcadores de la enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por depósitos de placas amiloides (fragmentos de proteína beta amiloide agrupados) y ovillos neurofibrilares (agregados de proteína tau hiperfosforilada). Una acumulación de placas amiloides tóxicas puede conducir a la destrucción de los cuerpos celulares neuronales, las dendritas y la pérdida sináptica que causan deterioro de la neurotransmisión y disminución de las capacidades cognitivas. Las áreas inicialmente afectadas son el hipocampo, la corteza entorrinal y las áreas posteriores de asociación cortical. También hay una pérdida neuronal subcortical en el núcleo basal Meynert y el locus coeruleus, origen de proyecciones corticales e hipocampales. Los primeros síntomas de la enfermedad no aparecen hasta que se alcanza un umbral de degeneración neurofibrilar y depósitos de amiloide.

Las pocas autopsias que se han completado mostraron menos marcadores de EA en los *super-ancianos* en comparación con los grupos de control, lo que indica que los cambios de Alzheimer son menos prominentes en ellos (64, 72, 73).

Rogalski et al. (65) compararon las densidades de ovillos neurofibrilares y placas amiloides en toda la circunvolución cingulada en secciones cerebrales de cinco *super-ancianos* (88.6 años) con los de cinco controles normales cognitivamente promedio de una edad similar (90.2 años). Sus datos demostraron que no se encontraron ovillos o placas en ninguno de los cinco *super-ancianos*, sin embargo en los controles ancianos cognitivamente normales, aparecieron en alta densidad cubriendo la mayor parte de la circunvolución cingulada anterior. Además, otro estudio ha confirmado los resultados informando de menor acumulación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares en el área cingulada de los *super-ancianos* (67).

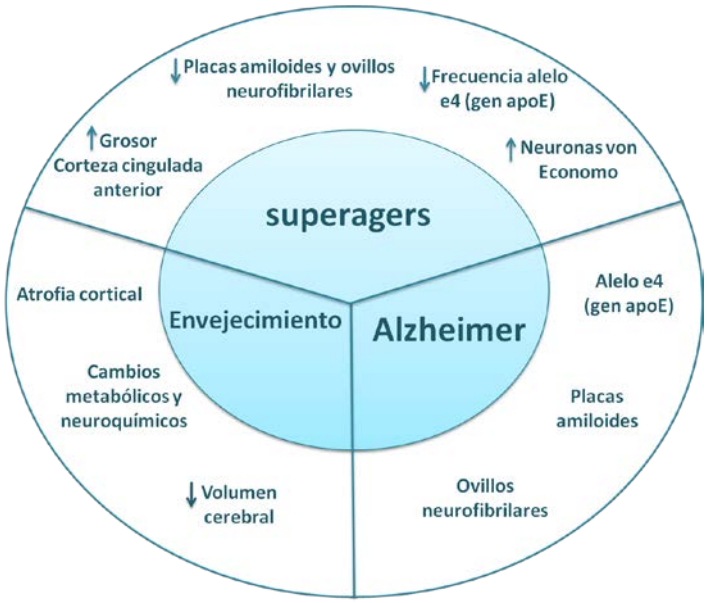


Fig 2. Ítem característico en el envejecimiento normal, enfermedad del Alzheimer y en los super-ancianos.

Uno de los principales factores de riesgo genéticos que han sido implicados en la EA es el gen que codifica la apolipoproteína E (apoE). Hasta ahora, se han descrito tres alelos del gen apoE (e2, e3 y e4). El e3 es el alelo más común que se encuentra en más de la mitad de la población (80%), mientras que e2 es el menos prevalente. El alelo e4 está presente en el 15% de la población europea y está sobrerrepresentado en pacientes con EA. La frecuencia del alelo e4 es aproximadamente dos veces mayor en los grupos de EA que en los controles de la

misma edad (74). Varios estudios han demostrado que un mayor número de placas amiloides en el cerebro (75), reducido volumen del hipocampo (76) y disminuido metabolismo cortical (77) pueden asociarse con el alelo e4, así como el adelanto en la edad de aparición de la enfermedad (78–80).

El análisis del ADN ApoE de *super-ancianos* en el estudio de Rogalski et al. (65) ha revelado que solo uno de los 12 *super-ancianos* (8,3%) tenía alelo e4 (con el genotipo e3: e4), mientras que todos los demás presentaban el alelo e3 (e3, e3). Por el contrario, 89 de 330 individuos (26,9%) en la muestra de control no demencial tenían al menos un alelo e4 (65). Un estudio posterior obtiene un porcentaje más elevado (20%) aunque sigue siendo inferior al del grupo control (73). La frecuencia más baja de alelo e4 de apoE en *super-ancianos* podría asociarse con memoria conservada y volumen cortical, previniendo los cambios degenerativos de Alzheimer (65). Además, se han descrito tres polimorfismo de de un único núcleotido (SNPs, por sus siglas en inglés) del gen de MAP2K3 gene, enzima implicada en la apoptosis desencadenada por beta-amiloide y relacionada con rutas moleculares asociadas a memoria (81).

Neuronas Von Economo

Las neuronas Von Economo (VEN) son neuronas en forma de huso ubicadas en la quinta capa de la corteza insular y en la corteza cingulada anterior. Parecen desempeñar un papel importante en la transmisión rápida de información en el comportamiento relacionado con las redes sociales. Estas neuronas son especialmente vulnerables a la patología de EA pero no muestran decaimiento con la edad en ausencia de la enfermedad. Sin embargo, el análisis estereológico post-mortem de cerebros de *super-ancianos* indica la existencia de mayor densidad de neuronas VEN en comparación con grupos control de su misma edad o con cohortes más jóvenes entre 20-60 años (73).

Además de las características neuroanatómicas peculiares, los super-ancianos no parecen ser vulnerables a los cambios psicológicos asociados a la edad avanzada. Durante el envejecimiento se ha descrito un declive en variables de personalidad tales como extraversión y búsqueda de experiencias junto a un aumento de neuroticismo. Sin embargo, no está clara la relación con el decaimiento de la memoria asociado a estas edades. El hecho de que los *super-ancianos* no

muestren alteraciones de la personalidad apoya un papel causal del declive cognitivo en las alteraciones de personalidad (65). Efectivamente los *super-ancianos* se muestran más interesados que sus controles en nuevas actividades y contactos sociales (69). Son también más optimistas y positivos frente a las dificultades y tienen un estilo de vida más activa.

Asimismo, el estudio de los *super-ancianos* permite reflexionar sobre el papel de la reserva cognitiva en el envejecimiento saludable. Aunque se trata de un concepto muy empleado en la actualidad para explicar el envejecimiento saludable, la investigación de los *super-ancianos* no permite caracterizarlo en términos biológicos. De hecho, en la mayor parte de los estudios no hay diferencias en inteligencia o nivel educativo entre *super-ancianos* y controles. Se ha demostrado que el nivel de educación de los *super-ancianos* no es anormalmente elevado (67). Tampoco se han encontrado diferencias en la incidencia del alelo 2 de ApoE, alelo que se ha propuesto como protector frente a EA. Es más, a pesar de los resultados que indican un cerebro más joven (82), en todos los casos de *super-ancianos* estudiados en el último informe que emplea cerebros post-mortem se han descrito ovillos neurofibrilares en el hipocampo y corteza entorrinal (73).

Por tanto, ni la estimulación enriquecida, ni la genética, ni la ausencia de neurodegeneración permiten explicar de forma completa por el momento las capacidades de memoria excepcionalmente preservadas es este grupo. El caso de los *super-ancianos* continúa siendo un misterio a resolver y va ligado al rompecabezas que supone la comprensión del complejo proceso que representa el envejecimiento.

Agradecimientos

Financiado por los proyectos de investigación PSI2014-57643-P, PSI2017-86381-P (MINECO.España)

Bibliografía

1. Kowal P, Goodkind D, He W. An Aging World: (2015). International Population Reports. National Institute on aging (NIA).

2. Bourlière F. (1970). The assessment of biological age in man. Geneva: World Health Organization.

3. Fraser GE, Singh PN, Bennett H. (1996). Variables associated with cognitive function in elderly California Seventh-day Adventists. Am J Epidemiol 143:1181–1190.

4. Gallagher M, Rapp PR. (1997). The use of animal models to study the effects of aging on cognition. Annu Rev Psychol 48:339–370.

5. Brown RE. (2016). Hebb and Cattell: The Genesis of the Theory of Fluid and Crystallized Intelligence. Front Hum Neurosci 10:606.

6. Hebb, DO. (1942). The effect of early and late brain injury upon test scores, and the nature of normal adult intelligence. Proc Am Philos Soc 85:275–292.

7. Yuan P, Voelkle MC, Raz N. (2018). Fluid intelligence and gross structural properties of the cerebral cortex in middle-aged and older adults: A multi-occasion longitudinal study. Neuroimage 172:21–30.

8. Haaland KY, Price L, Larue A. (2003). What does the WMS-III tell us about memory changes with normal aging? J Int Neuropsychol Soc 9:89–96.

9. Whiting WL, Smith AD. (1997). Differential age-related processing limitations in recall and recognition tasks. Psychol Aging 12:216–224.

10. Henson RNA, Cansino S, Herron JE, Robb WGK, Rugg MD. (2003). A familiarity signal in human anterior medial temporal cortex? Hippocampus 13:301–304.

11. Schacter DL. (1987). Implicit expressions of memory in organic amnesia: learning of new facts and associations. Hum Neurobiol 6:107–118.

12. Squire LR, Zola-Morgan S. (1988). Memory: brain systems and behavior. Trends Neurosci 11:170–175.

13. Squire LR, Ojemann JG, Miezin FM, Petersen SE, Videen TO, Raichle ME. (1992). Activation of the hippocampus in normal humans: a functional anatomical study of memory. Proc Natl Acad Sci USA 89:1837–1841.

14. Squire LR, Genzel L, Wixted JT, Morris RG. (2015). Memory consolidation. Cold Spring Harb Perspect Biol 7:a021766.

15. Buckner RL. (2004). Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate. Neuron 44:195–208.

16. Rönnlund M, Nyberg L, Bäckman L, Nilsson L-G. (2005). Stability, growth, and decline in adult life span development of declarative memory: cross-sectional and longitudinal data from a population-based study. Psychol Aging 20:3–18.

17. Braver TS, Barch DM. (2002). A theory of cognitive control, aging cognition, and neuromodulation. Neurosci Biobehav Rev 26:809–817.

18. Coria-Balanzat F. (2006). Advances in molecular pathology of Alzheimer's disease. Rev Neurol 42:306–309.

19. Gómez-Chacón B, Morillas E, Gallo M. (2015). Altered perirhinal cortex activity patterns during taste neophobia and their habituation in aged rats. Behav Brain Res 281:245–249.

20. Duque-Parra JE. (2003). Neurobiological relations and aging]. Rev Neurol 36:549–554.

21. León-Carrión J, Atutxa AM, Mangas MA, Soto-Moreno A, Pumar A, Leon-Justel A, Martín-Rodriguez JF, Venegas E, Domínguez-Morales MR, Leal-Cerro A. (2009). A clinical profile of

memory impairment in humans due to endogenous glucocorticoid excess. Clin Endocrinol (Oxf) 70:192–200.

22. Lister JP, Barnes CA. (2009). Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. Arch Neurol 66:829–833.

23. Gispen WH. (1993). Neuronal plasticity and function. Clin Neuropharmacol 16 Suppl 1:S5-11.

24. Stern Y. (2002). What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. J Int Neuropsychol Soc 8:448–460.

25. Mirmiran M, van Someren EJ, Swaab DF. (1996). Is brain plasticity preserved during aging and in Alzheimer’s disease? Behav Brain Res 78:43–48.

26. Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y. (2000). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. Proc Natl Acad Sci USA 97:12880–12884.

27. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. Nat Rev Neurosci 1:191–198.

28. Comery TA, Stamoudis CX, Irwin SA, Greenough WT. (1996). Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment. Neurobiol Learn Mem 66:93–96.

29. Rosenzweig MR, Bennett EL. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. Behav Brain Res 78:57–65.

30. Hamilton DA, Kolb B. (2005). Differential effects of nicotine and complex housing on subsequent experience-dependent structural plasticity in the nucleus accumbens. Behav Neurosci 119:355–365.

31. Kolb B, Gorny G, Söderpalm AHV, Robinson TE. (2003). Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens. Synapse 48:149–153.

32. Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L. (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. Behav Brain Res 163:78–90.

33. Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Diamond MC, Eriksson PS, Bogdanovic N. (2002). Environmental enrichment and the brain. Prog Brain Res 138:109–133.

34. Del Arco A, Segovia G, Canales JJ, Garrido P, de Blas M, García-Verdugo JM, Mora F. (2007). Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. J Neural Transm (Vienna) 114:43–48.

35. Segovia G, Yagüe AG, García-Verdugo JM, Mora F. (2006). Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. Brain Res Bull 70:8–14.

36. Diamond MC, Johnson RE, Protti AM, Ott C, Kajisa L. (1985). Plasticity in the 904-day-old male rat cerebral cortex. Exp Neurol 87:309–317.

37. Mirmiran M, Van Gool WA, Van Haaren F, Polak CE. (1986). Environmental influences on brain and behavior in aging and Alzheimer's disease. Prog Brain Res 70:443–459.

38. Kempermann G, Gast D, Gage FH. (2002). Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. Ann Neurol 52:135–143.

39. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. J Neurosci 18:3206–3212.

40. Soffié M, Hahn K, Terao E, Eclancher F. (1999). Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. Behav Brain Res 101:37–49.

41. Milgram NW, Head E, Zicker SC, Ikeda-Douglas CJ, Murphey H, Muggenburg B, Siwak C, Tapp D, Cotman CW. (2005). Learning ability in aged beagle dogs is preserved by behavioral enrichment and dietary fortification: a two-year longitudinal study. Neurobiol Aging 26:77–90.

42. Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Diamond MC, Eriksson PS, Bogdanovic N. (2002). Environmental enrichment and the brain. Prog Brain Res 138:109–133.

43. Marx J. (2005). Alzheimer's disease. Play and exercise protect mouse brain from amyloid buildup. Science 307:1547.

44. van Gelder BM, Tijhuis M a. R, Kalmijn S, Giampaoli S, Nissinen A, Kromhout D. (2004). Physical activity in relation to cognitive decline in elderly men: the FINE Study. Neurology 63:2316–2321.

45. Mattson MP, Magnus T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. Nat Rev Neurosci 7:278–294.

46. Nithianantharajah J, Hannan AJ. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. Nat Rev Neurosci 7:697–709.

47. Burke SN, Barnes CA. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. Nat Rev Neurosci 7:30–40.

48. Del Arco A, Segovia G, Mora F. (2001). Dopamine release during stress in the prefrontal cortex of the rat decreases with age. Neuroreport 12:4019–4022.

49. Segovia G, Porras A, Del Arco A, Mora F. (2001). Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. Mech Ageing Dev 122:1–29.

50. Pedigo NW. (1994). Neurotransmitter receptor plasticity in aging. Life Sci 55:1985–1991.

51. Hof PR, Morrison JH. (2004). The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. Trends Neurosci 27:607–613.

52. Schaie KW. (1994). The course of adult intellectual development. Am Psychol 49:304–313.

53. Launer LJ, Masaki K, Petrovitch H, Foley D, Havlik RJ. (1995). The association between midlife blood pressure levels and late-life cognitive function. The Honolulu-Asia Aging Study. JAMA 274:1846–1851.

54. Fratiglioni L, Mangialasche F, Qiu C. (2010). Brain aging: lessons from community studies. Nutr Rev 68 Suppl 2:S119-127.

55. Cotman CW, Berchtold NC. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. Trends Neurosci 25:295–301.

56. Vaynman S, Ying Z, Gómez-Pinilla F. (2004). Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields. J Neurosci Res 76:356–362.

57. Jedrziewski MK, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. (2007). Physical activity and cognitive health. Alzheimers Dement 3:98–108.

58. Bendlin BB, Carlsson CM, Gleason CE, Johnson SC, Sodhi A, Gallagher CL, Puglielli L, Engelman CD, Ries ML, Xu G, Wharton W, Asthana S. (2010). Midlife predictors of Alzheimer’s disease. Maturitas 65:131–137.

59. Gates N, Valenzuela M. (2010). Cognitive exercise and its role in cognitive function in older adults. Curr Psychiatry Rep 12:20–27.

60. McEwen BS. (2008). Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. Eur J Pharmacol 583:174–185.

61. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. Nat Rev Neurosci 10:434–445.

62. Patel PD, Lopez JF, Lyons DM, Burke S, Wallace M, Schatzberg AF. (2000). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. J Psychiatr Res 34:383–392.

63. Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, Schaefer EJ, Cupples AL, Lipton R, Cheng S, Shuldiner AR. (2003). Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. JAMA 290:2030–2040.

64. Harrison TM, Weintraub S, Mesulam M-M, Rogalski E. (2012). Superior memory and higher cortical volumes in unusually successful cognitive aging. J Int Neuropsychol Soc 18:1081–1085.

65. Rogalski EJ, Gefen T, Shi J, Samimi M, Bigio E, Weintraub S, Geula C, Mesulam M-M. (2013). Youthful memory capacity in old brains: anatomic and genetic clues from the Northwestern SuperAging Project. J Cogn Neurosci 25:29–36.

66. Gefen T, Shaw E, Whitney K, Martersteck A, Stratton J, Rademaker A, Weintraub S, Mesulam M-M, Rogalski E. (2014). Longitudinal neuropsychological performance of cognitive SuperAgers. J Am Geriatr Soc 62:1598–1600.

67. Gefen T, Peterson M, Papastefan ST, Martersteck A, Whitney K, Rademaker A, Bigio EH, Weintraub S, Rogalski E, Mesulam M-M, Geula C. (2015). Morphometric and histologic substrates of cingulate integrity in elders with exceptional memory capacity. J Neurosci 35:1781–1791.

68. Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. (2012). The neuropsychological profile of Alzheimer disease. Cold Spring Harb Perspect Med 2:a006171.

69. Cook AH, Sridhar J, Ohm D, Rademaker A, Mesulam M-M, Weintraub S, Rogalski E. (2017). Rates of Cortical Atrophy in Adults 80 Years and Older With Superior vs Average Episodic Memory. JAMA 317:1373–1375.

70. McGinnis SM, Brickhouse M, Pascual B, Dickerson BC. (2011). Age-related changes in the thickness of cortical zones in humans. Brain Topogr 24:279–291.

71. Bakkour A, Morris JC, Wolk DA, Dickerson BC. (2013). The effects of aging and Alzheimer's disease on cerebral cortical anatomy: specificity and differential relationships with cognition. Neuroimage 76:332–344.

72. Rogalski E, Sridhar J, Rader B, Martersteck A, Chen K, Cobia D, Thompson CK, Weintraub S, Bigio EH, Mesulam M-M. (2016). Aphasic variant of Alzheimer disease: Clinical, anatomic, and genetic features. Neurology 87:1337–1343.

73. Rogalski E, Gefen T, Mao Q, Connelly M, Weintraub S, Geula C, Bigio EH, Mesulam M-M. (2018). Cognitive trajectories and spectrum of neuropathology in SuperAgers: The first 10 cases. Hippocampus.

74. Roses AD, Saunders AM. (1997). ApoE, Alzheimer's disease, and recovery from brain stress. Ann N Y Acad Sci 826:200–212.

75. Kumar A, Nisha CM, Silakari C, Sharma I, Anusha K, Gupta N, Nair P, Tripathi T, Kumar A. (2016). Current and novel therapeutic molecules and targets in Alzheimer's disease. J Formos Med Assoc 115:3–10.

76. Lind J, Larsson A, Persson J, Ingvar M, Nilsson L-G, Bäckman L, Adolfsson R, Cruts M, Sleegers K, Van Broeckhoven C, Nyberg L. (2006). Reduced hippocampal volume in non-demented carriers of the apolipoprotein E epsilon4: relation to chronological age and recognition memory. Neurosci Lett 396:23–27.

77. Reiman EM, Caselli RJ, Yun LS, Chen K, Bandy D, Minoshima S, Thibodeau SN, Osborne D. (1996). Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. N Engl J Med 334:752–758.

78. Albrecht MA, Szoeke C, Maruff P, Savage G, Lautenschlager NT, Ellis KA, Taddei K, Martins R, Masters CL, Ames D, Foster JK, AIBL Research Group. (2015). Longitudinal cognitive decline in the AIBL cohort: The role of APOE ε4 status. Neuropsychologia 75:411–419.

79. De Luca V, Orfei MD, Gaudenzi S, Caltagirone C, Spalletta G. (2016). Inverse effect of the APOE epsilon4 allele in late- and early-onset Alzheimer's disease. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 266:599–606.

80. Rezazadeh M, Khorrami A, Yeghaneh T, Talebi M, Kiani SJ, Heshmati Y, Gharesouran J. (2016). Genetic Factors Affecting Late-Onset Alzheimer's Disease Susceptibility. Neuromolecular Med 18:37–49.

81. Huentelman MJ, Piras IS, Siniard AL, De Both MD, Richholt RF, Balak CD, Jamshidi P, Bigio EH, Weintraub S, Loyer ET, Mesulam M-M, Geula C, Rogalski EJ. (2018). Associations of MAP2K3 Gene Variants With Superior Memory in SuperAgers. Front Aging Neurosci 10:155.

82. Sun FW, Stepanovic MR, Andreano J, Barrett LF, Touroutoglou A, Dickerson BC. (2016). Youthful Brains in Older Adults: Preserved Neuroanatomy in the Default Mode and Salience Networks Contributes to Youthful Memory in Superaging. J Neurosci 36:9659–9668.

Captítulo 14

La neofobia y su atenuación: relación entre el sistema gustativo y la memoria de reconocimiento en roedores

Menchén-Márquez S, Gallo M.

Resumen

La memoria de reconocimiento ha sido utilizada como un método eficaz para estudiar la memoria y su funcionamiento. Aunque ha sido más estudiada desde la modalidad visual, la memoria de reconocimiento gustativa tiene aspectos distintivos que la convierten en una interesante línea de investigación. En este sentido, se revisa la participación de las áreas cerebrales que conforman el sistema gustativo y cómo se relacionan con aquellas implicadas en memoria de reconocimiento que son comunes a distintos sistemas sensoriales., Asimismo, se analizan las características que no están presentes en otras modalidades sensoriales y que podrían influir en la organización del circuito neural responsable, como son las propiedades de los sabores. Se trata de definir con precisión la memoria de reconocimiento gustativo para diferenciarla de otros tipos de memoria analizando los componentes del sistema gustativo en roedores en relación con la neofobia gustativa y su atenuación.

Introducción

- **Los distintos tipos de memoria.**

El estudio de los diferentes sistemas de memoria ha sido de gran interés por la comunidad científica, dando lugar a una larga tradición de investigación. La memoria es el proceso responsable de la formación y retención de recuerdos, conceptos, información y sucesos, lo que resulta extremadamente complejo tanto en su organización anatómica como funcional.

Existen múltiples tipos de memoria que pueden ser diferenciadas o categorizadas en función de distintos criterios. Una distinción eficaz, basada principalmente en los estudios con pacientes amnésicos y con animales lesionados, son la *memoria a corto plazo*, un tipo de memoria de breve duración que es sensible al tiempo y recoge los sucesos recientes, y la *memoria a largo plazo*, conformada por aquellos recuerdos que se han transformado en resistentes al tiempo y que pueden ser recuperados en el futuro(1).Además de estos dos tipos, existe un tipo especial de memoria a corto plazo denominada *memoria de trabajo*, la cual permite mantener una cantidad limitada de información temporalmente(2)mientras se están llevando a cabo otros procesos cognitivos.

El estudio del caso del paciente H.M. (3)supuso un gran avance en cuanto a lo que el estudio de la memoria se refiere. H.M. fue un paciente al cual, debido a sus severos ataques epilépticos, se le extirparon bilateralmente los lóbulos temporales y, con ellos, el hipocampo y el giro parahipocampal(2).Como consecuencia, H.M. sufrió una fuerte amnesia retrógrada (esto es, de los sucesos anteriores a la operación) y una completa amnesia anterógrada (era incapaz de aprender cualquier suceso tras la operación). No obstante, se pudo comprobar que preservaba ciertas habilidades e incluso que era capaz de aprender nuevas mediante el entrenamiento, aunque no recordase haberlo hecho (por ejemplo, la tarea de dibujo en espejo)(2).

Estos datos llevaron a Squire (2, 4)a proponer una taxonomía para los distintos tipos de memoria a largo plazo, en la que se diferencia entre *memoria declarativa* y *memoria no declarativa*. Aunque anteriormente existían otras clasificaciones para la memoria, esta es la primera que intenta hacerlo relacionándola con sus bases neuroanatómicas.

La *memoria no declarativa* es una colección de procesos plásticos de los que no somos conscientes pero que modifican el comportamiento. Dentro de esta categoría entrarían las habilidades y los hábitos (por ejemplo, la habilidad de conducir un coche cuando se tiene experiencia), aprendizajes no asociativos (habituación y sensibilización) y asociativos (condicionamiento clásico), el efecto de primacia (facilitación por exposición previa a un estímulo) y el aprendizaje perceptivo(2). Estos tipos de memoria ocupan poca o nula carga atencional.

La *memoria declarativa*, por otra parte, puede dividirse en *memoria semántica* (conceptos abstractos, que dependen del lenguaje verbal) o *memoria episódica*(recuerdos situados en un momento y un lugar). Cuando un recuerdo relativo a la memoria episódica es adquirido, no sólo incluye el suceso en sí, sino una gran variedad de estímulos de distinta naturaleza (externos, como un sonido, un detalle visual, un sabor…; e internos, como la temperatura, dolor, placer…), que se encontraban en ese momento, y que en mayor o menor medida pueden ser asociados a dicha situación, incluso cuando no tienen relación alguna con ella(2, 4).

La memoria de reconocimiento requiere no solo recuperar recuerdos adquiridos sino también detectar nueva información que será incorporada. Se ha propuesto que los mecanismos cerebrales implicados en la detección de la novedad y de la familiaridad pueden disociarse del mismo modo que pueden disociarse los circuitos cerebrales implicados en detectar la novedad de un ítem o la del contexto en el que aparece (5). Uno de los aspectos importantes a la hora de identificar los circuitos cerebrales de la memoria de reconocimiento es la modalidad sensorial. La memoria de reconocimiento visual ha sido la más utilizada, tanto en humanos como en roedores. En las tareas empleadas, los humanos pueden verbalizar y comunicar directamente si reconocen una palabra u objeto que se le puede haber presentado anteriormente; en roedores se ha utilizado su reacción innata a explorar los objetos novedosos como método para cuantificar si un objeto le resulta familiar. La tarea se denomina *reconocimiento espontáneo de objetos*(6, 7).Estos estudios han permitido discernir las estructuras cerebrales que subyacen a la memoria de reconocimiento. En una reciente revisión, Warburton y Brown (6) apuntaban a una red conformada por el núcleo mediodorsal del tálamo, el córtex prefrontal medial, el hipocampo y la corteza perirrinal, principalmente.

- **La memoria de reconocimiento de sabores: la neofobia y su atenuación.**

Cuando un individuo prueba un sabor desconocido, tendrá una conducta de cautela y será reticente a ingerir ese alimento. Ese fenómeno, al que se le denomina *neofobiagustativa*, es un mecanismo mantenido a lo largo de la evolución que previene la ingesta de grandes cantidades de un alimento potencialmente tóxico que podría causar daños o incluso la muerte del individuo. Desde esta perspectiva, resulta un mecanismo extremadamente útil para la supervivencia(8), y ello explica que se haya mantenido en distintas especies, incluyendo mamíferos, reptiles, aves y peces (9).

La ingesta de una pequeña cantidad del sabor novedoso permite al animal evaluar su nivel de toxicidad de una forma más segura. En función de las consecuencias, pueden suceder dos cosas.

En primer lugar, que efectivamente el alimento fuera venenoso o perjudicial, y, en consecuencia, produzca malestar gástrico. En este caso, se desarrollará una aversión a dicho sabor, y en sucesivas ocasiones se evitará su consumo. Este fenómeno se conoce como *condicionamiento aversivo-gustativo* (CTA) (8–10).

En segundo lugar, si el consumo del sabor no tiene consecuencias, se incrementará progresivamente a medida que se reconozca como seguro hasta llegar a valores asintóticos, fenómeno conocido como *atenuación de la neofobia* (AN) (8). Tanto CTA como AN son cruciales para la selección de la dieta, permitiendo descartar los alimentos potencialmente perjudiciales y promoviendo la inclusión de alimentos o grupos de alimentos con los que no se han tenido experiencias negativas.

Se ha propuesto que tanto CTA como AN son un tipo de memoria de reconocimiento especial: la memoria de reconocimiento gustativo(8). Por su parte, el CTA ha sido una herramienta realmente útil para la delimitación de los circuitos implicados en este tipo de memoria, al tratarse de un tipo peculiar de condicionamiento clásico, dado que permite largas demoras entre la presentación del estímulo condicionado y el estímulo incondicionado que produce los efectos aversivos, y en condiciones normales, tan sólo requiere de un ensayo para ser aprendido(11). La AN, por su parte, aun habiendo sido menos utilizada que el CTA, también ha demostrado ser un paradigma fiable y útil en la investigación de la

memoria gustativa y los mecanismos subyacentes a esta, ofreciendo la posibilidad de estudiar cómo se consolidan las experiencias gustativas como seguras.

Además, mientras que la aversión gustativa resulta estable en el tiempo y resistente a la extinción, la AN resulta muy sensible a ser inhibida, por ejemplo, presentando un nuevo sabor distinto, al encontrarse el animal en condiciones de hipotermia, al administrar pentobarbital o shocks electroconvulsivos tras la exposición, etc. (8). Sin embargo, el haber atenuado un sabor (es decir, haberlo registrado como seguro) dificulta o retrasa la aparición del CTA a dicho sabor, fenómeno denominado *inhibición latente*.

- **Neuroanatomía funcional del sistema gustativo.**

Las células receptoras del sabor en los mamíferos se agrupan en las papilas gustativas a lo largo de la cavidad oral (12). Aunque las papilas gustativas se pueden encontrar en toda la cavidad oral, es en la lengua, en el paladar y en la laringe donde podemos encontrar una mayor cantidad de agrupaciones de estas estructuras(12, 13). Éstas se encuentran inervadas por neuronas, de los pares craneales: VII (facial), IX (glosofaríngeo) y X (vago). Dado que estas neuronas pueden responder a varios estímulos, será el patrón de activación de estas fibras el que indique la naturaleza de lo ingerido, aunque normalmente estas suelen ser clasificadas en función de la sustancia que provoque una mayor respuesta en ellas (12). Las papilas gustativas de la parte anterior de la lengua están inervadas por la cuerda del tímpano y el nervio petroso superficial mayor (fibras pertenecientes al nervio facial), mientras que las pertenecientes a la parte posterior de la lengua se encuentran inervadas por terminaciones glosofaríngeas provenientes de su ganglio petroso(13), también llamado ganglio de Andersch. El nervio vago inerva algunas papilas gustativas situadas en otras zonas de la cavidad oral distintas a la lengua.

La información de estos nervios llega directamente al primer relevo del sistema gustativo: el *núcleo del tracto solitario*. El núcleo del tracto solitario está formado por un conjunto de grupos neuronales que se disponen en forma de columna vertical a lo largo del bulbo raquídeo(12–14). Las aferencias gustativas muestran una distribución ordenada topográficamente en el núcleo. La información proveniente dela lengua y algunas otras partes de la cavidad oral llega a la parte

más rostral de la porción gustativa del núcleo del tracto solitario, mientras que las aferencias vagales provenientes de la laringe y la faringe llegan a la parte más caudal de dicho núcleo (13, 14).

En los roedores, el núcleo parabraquial recibe las aferencias gustativas provenientes de la parte rostral del núcleo del tracto solitario (8, 14). Este mantiene conexiones recíprocas con el tálamo gustativo y la corteza insular gustativa. Además, proyecta a estructuras tales como el hipotálamo lateral y las porciones central y basolateral de la amígdala, entre otras.

El *tálamo gustativo* es como se denomina a la porción parvocelular del núcleo ventroposteromedial del tálamo (VPMpc), y se trata una pequeña área correspondiente a la parte más medial de dicho núcleo. La denominación "tálamo gustativo" se debe a que es núcleo de relevo talámico del sistema gustativo y principalmente se dedica al procesamiento de la información gustativa, aunque su parte más lateral posee neuronas especializadas en el procesamiento de la información térmica y táctil proveniente de la lengua (10).

La *corteza insular gustativa* (GC), perteneciente al córtex insular, se considera el cortex gustativo primario (8, 10, 15). En ratas, se sitúa en la parte lateral del lóbulo temporal de cada hemisferio. La corteza insular está delimitada caudalmente por el cortex perirrinal y dorsalmente por el córtex somatosensorial. Se divide en tres partes, dependiendo de la presencia de la capa granular y los cambios en su organización laminar: el *córtex insular granular* (gGC), el *disgranular* (dGC) y el *agranular* (aGC), que se encuentran interconectados. En este nivel, se procesa la información gustativa proveniente, principalmente, del tálamo gustativo, la cual llega al dGC. El gGC recibe aferencias viscerales. En menor medida, y sólo en roedores, el núcleo parabraquial también proyecta al aGC (15).

- **Estructuras implicadas en la atenuación de la neofobia.**

Los circuitos subyacentes al procesamiento y la formación de los recuerdos seguros han sido ampliamente estudiados tanto anatómica como funcionalmente. El conocimiento de dichas estructuras y su rol en la formación de estos recuerdos puede permitir una mejor comprensión de una amplia gama de aplicaciones, desde cómo se establecen y cómo se pueden mejorar los hábitos nutricionales en la infancia a cómo se desarrollan deficiencias de memoria en la vejez (16).

Dado que los estímulos necesarios para la aparición de la neofobia y de la AN resultan principalmente gustativos, es lógico pensar que los principales núcleos de relevo del sistema gustativo tienen un fuerte papel en la aparición de estos fenómenos. A continuación, se hace un breve repaso sobre los hallazgos relacionados con dichas estructuras con roedores.

I. El núcleo parabraquial.

El segundo relevo del sistema gustativo, el *núcleo parabraquial* (PBN), pese a resultar imprescindible para el desarrollo de CTA(17, 18), no parece ser relevante en cuanto a la detección de la novedad. Así lo reflejaban Lin y colaboradores (19), que en un experimento exponían a ratas adultas a una solución de sacarina (0,5%)que eran sacrificadas bien tras la primera exposición, en la que se observaba la reacción neofóbica (grupo Novel) o bien tras la sexta, cuando los animales habían atenuado la neofobia (grupo Familiar).

Tras ello, obtuvieron secciones del cerebro de los animales que tiñeron mediante inmunohistoquímica de c-Fos, técnica que marca la proteína c-Fos que expresa el gen de expresión temprana *fos*, y la cual ha demostrado ser un índice fiable de actividad neural(19–21). Los resultados que Lin y su grupo obtuvieron indicaban que no había diferencias en el número de células c-Fos positivas entre los distintos grupos en el PBN medial. Por tanto, aunque el PBN sea una estructura importante en el procesamiento de la información gustativa, no parece tener un rol específico para la detección de novedad o su habituación.

II. El tálamo gustativo.

Sin embargo, en el caso del *tálamo gustativo* (VPMpc), Lin y colaboradores (19) encontraban claras diferencias en la activación del VPMpc durante la primera exposición a un sabor novedoso y cuando éste se había convertido en familiar. La activación fue mayor cuando las ratas eran expuestas por primera vez a la solución de sacarina al 0,5%. Parecería pues, que el VPMpc sí que juega un papel relevante en la detección de la novedad del sabor.

Pero posteriormente, Morillas (22),empleando también un paradigma de AN similar, pero utilizando como sabor novedoso una solución de vinagre de sidra (3%) y añadiendo un grupo adicional el segundo día (Familiar I), encontró

resultados opuestos a los obtenidos por Lin y su grupo(19).En este experimento, observó un mayor número de células c-Fos positivas en el grupo que había sido expuesto 6 días al sabor novedoso (Familiar II).

Si bien estos resultados corroboran el papel de VPMpc en la memoria de reconocimiento gustativa, plantean un nuevo problema, relativo a qué aspecto de la memoria de reconocimiento gustativo procesa: la novedad (y, por tanto, la presencia de un alimento potencialmente peligroso) o la familiaridad (o la presencia de un sabido alimento seguro). Dado que, en esencia, el procedimiento conductual al que se sometieron las ratas de ambos estudios fue similar, es necesario prestar atención al único elemento que es claramente distinto: el sabor utilizado. Aunque tanto la sacarina (0,5%) como el vinagre de sidra (3%)son, efectivamente, sabores que provocan una fuerte reacción neofóbica y que posteriormente es atenuada, son sabores con unas cualidades claramente distintas. Por ejemplo, el vinagre posee un componente olfativo (ácido acético) que no posee la sacarina. Por otro lado, se trata de sabores con una palatabilidad distinta, fenómeno que se ha relacionado con la neofobia y su atenuación(23) y que, por tanto, podría estar mediando en el papel del VPMpc y el procesamiento de la novedad.

Por último, las lesiones en el tálamo gustativo parecen eliminar la respuesta neofóbica del individuo, elevando el consumo del sabor novedoso en la primera exposición, sin diferir en lo ingerido en las sesiones posteriores en comparación con el grupo control (24).

III. La corteza gustativa.

El GC parece tener una estrecha relación con el aprendizaje gustativo. Lin y sus colaboradores (19), en el estudio mencionado anteriormente, también encontraron un mayor número de células c-Fos positivas en el grupo que tomó el sabor por primera vez en comparación con el grupo para el que el sabor se había convertido en familiar.

Mientras que la lesión unilateral del GC no afecta aparentemente a la neofobia o a su atenuación (25), su lesión bilateral elimina la respuesta neofóbica ante el sabor novedoso, como ocurría con el tálamo gustativo. Así lo demostraban Lin y sus colegas (26)en un experimento en el que, al realizar lesiones excitotóxicas

bilaterales del GC, encontraban que este grupo consumía hasta el doble de un sabor novedoso (quinina) en comparación con el grupo control.

Estos hallazgos indican que el GC tiene un papel importante en la respuesta neofóbica. Concretamente, estos estudios apuntan hacía un rol crítico en la detección de la peligrosidad de los alimentos. Dado que la reacción neofóbicaes una conducta de cautela respecto a lo desconocido y potencialmente peligroso, la desaparición de esta respuesta podría reflejar un déficit asociado a la ausencia del GC.

Adicionalmente, dado que la quinina resulta poco palatable, estos autores observaron cómo las ratas con la lesión en el GC percibían este alimento como mucho más palatable en comparación con el grupo control, lo que estaría en armonía con lo comentado anteriormente y con estudios del mismo grupo (23)en los que observaban que conforme la neofobia se iba atenuando (o dicho de otro modo, la neofobia desaparecía), aumentaba la palatabilidad por el alimento.

IV. La amígdala basolateral y la corteza perirrinal.

Además de los principales relevos del sistema gustativo, otras estructuras del cerebro juegan un papel crítico en la neofobia y su atenuación.

El papel de la *amígdala* en la neofobia gustativa ha sido cuestionado en numerosos estudios. Concretamente, Lin y Reilly (25) sometieron a un procedimiento de atenuación a la neofobia a ratas con lesiones simétricas y asimétricas del GC, de la amígdala basolateral (BLA) y de la amígdala medial (MeA). Tan solo las ratas con lesiones contralaterales en el GC y en la BLA presentaron un comportamiento anormal, bebiendo mayor cantidad de una solución de sacarina al 0,5% en la primera presentación en comparación con el resto de grupos. Por tanto, el GC y la BLA parecen trabajar juntos un circuito bilateral implicado en el reconocimiento de la novedad del sabor, y en ausencia de ambas, este se ve perjudicado. No obstante, la lesión de estas áreas de forma unilateral, como se demuestra en este estudio, o la inactivación de las distintas partes de la amígdala de forma bilateral (27), no parecen tener un efecto significativo sobre la neofobia o su atenuación. No obstante, el papel de la amígdala, y en concreto de la BLA, parece no estar claro.

En este sentido, Gómez-Chacón y colaboradores (21) lesionaron la BLA en ratas que fueron sometidas a un procedimiento de atenuación a la neofobia con vinagre de sidra, con intención de medir la actividad en el córtex perirrinal (PhR). En este caso, la lesión de la BLA sí provocó un mayor consumo del sabor novedoso en la primera exposición en comparación con el grupo control, mientras que el consumo fue similar al de la segunda exposición dentro del primer grupo (esto es, la reacción neofóbica desapareció o se atenuó). Además, encontraron un menor número de células c-Fos positivas en el PhR en el grupo Familiar en las ratas con la BLA lesionada, por lo que ambas estructuras parecen trabajar de forma conjunta en el aprendizaje gustativo. Posteriormente, este mismo grupo encontró que el patrón de activación de la PhR difería en función de la edad del sujeto, activándose más ante el estímulo novedoso en ratas adultas, y ante el estímulo familiar en ratas envejecidas (20).

En otro experimento, utilizando lesiones excitotóxicas en PhR y sometiendo a las ratas a un procedimiento de atenuación de neofobia con vinagre de sidra al 3%, Morillas et al. (28) encontraron que las ratas lesionadas tardaban más en atenuar la neofobia que el grupo control, mientras que la reacción neofóbica se mantuvo intacta en ambos grupos. Estos datos, sin embargo, resultan contradictorios con los obtenidos por Ramos (29), quien halló, utilizando soluciones con distintas concentraciones de sacarina, una desaparición de la respuesta neofóbica en el grupo con PhR lesionado. Morillas et al. atribuyen los distintos resultados a diferencias procedimentales (27).Por tanto, resulta evidente que la PhR tiene un papel relevante en el aprendizaje gustativo, aunque queda por determinar la naturaleza concreta de su participación.

Además de las mencionadas, existen varias estructuras que han sido estudiadas en relación con el procesamiento de la neofobia y su atenuación. En especial, cabe mencionar el hipocampo y el sistema parahipocampal [por ejemplo, (26, 28)].

Conclusiones.

La memoria de reconocimiento gustativa cuenta con una larga tradición en la investigación de los sustratos neurales del aprendizaje y la memoria. Así, si bien todas las estructuras mencionadas resultan importantes para el reconocimiento de

sabores, queda por esclarecer la participación de cada una de ellas en las diversas fases del proceso.

Si bien varias de las estructuras implicadas en la memoria de reconocimiento gustativa lo están también en la memoria de reconocimiento visual y, probablemente, en la de otras modalidades sensoriales (por ejemplo, la corteza perirrinal o el hipocampo), pueden identificarse mecanismos propios de cada modalidad sensorial. En el caso de la memoria de reconocimiento gustativa participan en el circuito responsable el GT y el GC.

Una vez identificado el circuito neural se hace necesario investigar el papel de distintas variables, como las características del alimento (asociación a claves visuales, olfativas o táctiles, si resulta agradable o no agradable, el tipo de sabor, etc.) del contexto en el que se ha consumido o del propio sujeto (como la edad o experiencias previas). Ello puede poner en juego un complejo sistema de memoria en el que interaccionen diversos circuitos neurales con funciones disociables.

Agradecimientos

Financiado por los proyectos de investigación PSI2014-57643-P y PSI2017-86381-P (MINECO. España) y por una beca FPU (#16/06017, MECD, España) concedida a Sergio Menchén Márquez.

Bibliografía.

1. Winocur G, Moscovitch M, Bontempi B. (2010). Memory formation and long-term retention in humans and animals: convergence towards a transformation account of hippocampal-neocortical interactions. Neuropsychologia 48:2339–2356.

2. Squire LR, Dede AJO. (2015). Conscious and unconscious memory systems. Cold Spring Harb Perspect Biol 7:a021667.

3. Scoville WB, Milner B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J Neurol Neurosurg Psychiatry 20:11–21.

4. Squire LR, Zola SM. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. Proc Natl Acad Sci 93:13515–13522.

5. Kafkas A, Montaldi D. (2018). How do memory systems detect and respond to novelty? Neurosci Lett.

6. Gámiz F, Gallo M. (2012). Spontaneous object recognition memory in aged rats: Complexity versus similarity. Learn Mem Cold Spring Harb N 19:444–448.

7. Warburton EC, Brown MW. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. Behav Brain Res 285:131–139.

8. Bermúdez-Rattoni F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. Nat Rev Neurosci 5:209–217.

9. Reilly S. (2017). Taste neophobia: Neural substrates and palatability, p. 77–109. In Reilly, S (ed.), Food neophobia: Behavioral and Biological influences. Woodhead Publishing/Elsevier, Duxford (UK).

10. Reilly S. (1998). The role of the gustatory thalamus in taste-guided behavior. Neurosci Biobehav Rev 22:883–901.

11. Gallo M, Ballesteros MA, Molero A, Morón I. (1999). Taste Aversion Learning as a Tool for the Study of Hippocampal and Non-Hippocampal Brain Memory Circuits Regulating Diet Selection. Nutr Neurosci 2:277–302.

12. Norgren R. (1983). The gustatory system in mammals. Am J Otolaryngol 4:234–237.

13. Matsumoto I. (2013). Gustatory neural pathways revealed by genetic tracing from taste receptor cells. Biosci Biotechnol Biochem 77:1359–1362.

14. King MS. (2007). Anatomy of the Rostral Nucleus of the Solitary Tract, p. . In Bradley, RM (ed.), The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).

15. Maffei A, Haley M, Fontanini A. (2012). Neural processing of gustatory information in insular circuits. Curr Opin Neurobiol 22:709–716.

16. Gallo M. (2018). Taste neophobia over the life span, p. 25–41. In Reilly, S (ed.), Food neophobia: Behavioral and Biological influences. Woodhead Publishing/Elsevier, Duxford (UK).

17. Ballesteros MA, González F, Morón I, DeBrugada I, Cándido A, Gallo M. (2002). Dissociation of the associative and visceral sensory components of taste aversion learning by tetrodotoxin inactivation of the parabrachial nucleus in rats. Neurosci Lett 322:169–172.

18. Grigson PS, Reilly S, Scalera G, Norgren R. (1998). The parabrachial nucleus is essential for acquisition of a conditioned odor aversion in rats. Behav Neurosci 112:1104–1113.

19. Lin J-Y, Roman C, Arthurs J, Reilly S. (2012). Taste neophobia and c-Fos expression in the rat brain. Brain Res 1448:82–88.

20. Gómez-Chacón B, Morillas E, Gallo M. (2015). Altered perirhinal cortex activity patterns during taste neophobia and their habituation in aged rats. Behav Brain Res 281:245–249.

21. Gómez-Chacón B, Gámiz F, Gallo M. (2012). Basolateral amygdala lesions attenuate safe taste memory-related c-fos expression in the rat perirhinal cortex. Behav Brain Res 230:418–422.

22. Morillas E. (2016). Increased thalamic activity related to taste familiarity assessed by Fos inmunohistochemistry, p. 107–123. In Circuitos cerebrales y memoria de reconocimiento en roedores: efecto de exposición a sabores (tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada, España.

23. Lin J-Y, Amodeo LR, Arthurs J, Reilly S. (2012). Taste neophobia and palatability: the pleasure of drinking. Physiol Behav 106:515–519.

24. Arthurs J, Reilly S. (2013). Role of the gustatory thalamus in taste learning. Behav Brain Res 250:9–17.

25. Lin J-Y, Reilly S. (2012). Amygdala-gustatory insular cortex connections and taste neophobia. Behav Brain Res 235:182–188.

26. Lin J-Y, Arthurs J, Reilly S. (2015). Gustatory insular cortex, aversive taste memory and taste neophobia. Neurobiol Learn Mem 119:77–84.

27. De la Cruz V, Rodríguez-Ortiz CJ, Balderas I, Bermúdez-Rattoni F. (2008). Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. Eur J Neurosci 28:1377–1381.

28. Morillas E, Gómez-Chacón B, Gallo M. (2017). Flavor and object recognition memory impairment induced by excitotoxic lesions of the perirhinal cortex. Neurobiol Learn Mem 144:230–234.

29. Ramos JMJ. (2015). Differential contribution of perirhinal cortex and hippocampus to taste neophobia: effect of neurotoxic lesions. Behav Brain Res 284:94–102.

Capítulo 15

Modelo de abuso de alcohol en ratones: Desarrollo del paradigma "Driking in the Dark" en cepa de baja preferencia

Ruiz-Leyva L, Jiménez García, AM, Morón I, Cendán CM.

Resumen

El consumo excesivo de alcohol es uno de los principales problemas relacionados con el abuso de sustancias en la sociedad actual. Para estudiar los desencadenantes y consecuencias de dicho consumo excesivo se usan modelos animales que desarrollen la conducta de abuso. Para el presente estudio se planteó como objetivo probar en un paradigma de consumo de altas cantidades de alcohol, denominado "Drinking in the Dark" (DID), distintas concentraciones de alcohol en una cepa de ratones que muestran baja preferencia hacia su consumo, como es la cepa CD-1. Para ello se utilizaron un total de 30 ratones CD-1 hembradivididos en 3 grupos experimentales distintos, donde cada uno de ellos se expuso a una solución de alcohol diferente (0, 4 y 8%). Se comprobó que al 4º día del procedimiento se producía un mayor consumo para todas las soluciones evaluadas (efecto DID), observándose que los ratones que fueron expuestos a una concentración de alcoholde 8% bebían significativamente más que los ratones control y que aquellos que tuvieron acceso a una solución de alcohol menos concentrada (4%). Estos resultados indican que los ratones de la cepa CD-1, pese a ser una cepa de bajo consumo, responde al paradigma DID, pudiendo ser útil su uso para estudios de consumo voluntario de alcohol en ratones como modelo traslacional para estudiar posibles tratamientos para el alcoholismo.

Introducción

El alcoholismo es uno de los mayores problemas de salud pública en la actualidad. El informe de situación mundial sobre el alcohol y la salud publicado por la OMS señala que cada año se producen 3,3 millones de muertes en el mundo debido al consumo abusivo de alcohol, es decir, el 5,9% de todas las defunciones a nivel mundial (1). Más allá de las consecuencias sanitarias, el consumo abusivo de alcohol provoca pérdidas sociales y económicas importantes, tanto para las personas como para la sociedad en su conjunto. Con estos antecedentes se hace necesaria la realización de estudios que nos ayuden a comprender qué factores intervienen tanto en el inicio del consumo como en su mantenimiento y abuso. Debido a que las investigaciones a nivel clínico y con humanos tienen dificultad para identificar la etiología del consumo de alcohol (2), se tornan fundamentales el uso de ensayos preclínicos para la comprensión de los factores que llevan al consumo de alcohol y todas las consecuencias derivadas del mismo. Dentro de los ensayos preclínicos, es de vital importancia la experimentación en modelos animales, la cual nos ofrece la posibilidad de un mayor control experimental, y más facilidad de manipulación de variables, ya sean de tipo psicológicas, fisiológicas, genéticas o neurofisiológicas (3).

Existen distintos tipos de paradigmas para inducir el consumo (o abuso) de alcohol en animales de experimentación (3):

- Los paradigmas donde los animales son forzados a consumir la sustancia como puede ser mediante la exposición a vapores de alcohol o la inoculación directa a través de distintas vías como puede ser intragástrica o intraperitoneal.
- Otros en los que la sustancia, en este caso alcohol, se mezcla con distintas concentraciones de sucrosa para enmascarar su sabor aversivo y así favorecer el consumo.
- Por último,los paradigmas de consumo voluntario. En ellos, el animal tiene la libre elección para consumir la sustancia, normalmente mediante la presentación de dos botellas de bebida, una con la solución y otra con agua (*2-bottle choiceprocedure*). Otro paradigma que podemos considerar voluntario es el llamado "*Drinking in theDark*" (DID) ya que, aunque no usa necesariamente dos botellas de bebida para dar la opción de ingesta de

líquido sin etanol, el tiempo que animal tiene a su alcance la solución de alcohol es lo suficientemente breve como para evitar la ingesta si así lo decidiera (4).

El caso del DID (en cepas de ratones de alta preferencia) se expone al animal al alcohol a las tres horas del inicio del ciclo de oscuridad durante cuatro días seguidos por un periodo de tres (en los tres primeros días) o cuatro horas (en el último día). En el último día puede observarse un incremento agudo limitado a ese día en el consumo de alcohol. De este modo se produce un potente autoconsumo por parte de los ratones y permitirá realizar estudios farmacológicos de manera relativamente rápida.

Teniendo en cuenta las favorables características del DID, como son el ser un procedimiento de consumo voluntario, consistente y rápido; resulta de sumo interés probar dicho procedimiento en cepas de baja preferencia como es la cepa CD-1 (5), con la finalidad de usar el paradigma para realizar estudios farmacológicos en dicha cepa.

Material y métodos

Para el presente experimento se usaron un total de 30 ratones CD-1 hembra (Charles River Laboratorios, S.A.) de 21-25g con una edad aproximada de 8 semanas.Los ratones se mantuvieron individualizados, a unas condiciones constantes de humedad y temperatura (21ºC). Su ciclo de luz – oscuridad fue de 12 horas (18:00 – 06:00h). Los 30 ratones fueron divididos en tres grupos de 10 animales cada uno: un grupo control (H2O) y dos experimentales (4% y 8%). El procedimiento conductual se realizó en la jaula hogar habitual para cada uno de los animales. Para la exposición a la solución de etanol (al 4% o 8% en agua en función del grupo experimental) o a agua se usaron botellas con boquilla antigoteo.

Durante los días 1 – 3 de experimento se procedió a la presentación a cada animal de una solución (etanol al 4%, 8% o agua) en función de su grupo experimental. La presentación era llevada a cabo durante 120 minutos pasados 180 minutos tras el inicio del ciclo de noche. En el caso de los días 4 – 5 el tiempo de exposición se extendía hasta un total de 240 minutos. Se consideró la inclusión de un 5º día de procedimiento para observar la tendencia en el consumo pasado el protocolo desarrollado por Thiele y colaboradores (4). Finalmente, para la

medición del consumo de solución se procedió al pesado de las botellas antes y después de la exposición.

Las diferencias entre los valores fueron analizadas usando un ANOVA mixto mediante el programa SPSS 20.0. Como pruebas Post-Hoc se realizó el test de Bonferroni. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando los valores de P fueron inferiores a 0.05.

Todas las acciones realizadas en los experimentos aquí expuestos fueron aprobadas por el Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Granada y por la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía.

Resultados

Se analizó la variable consumo de solución obteniéndose los siguientes resultados.

Se analizó la interacción entre el factor “grupo” y “día” obteniendo una relación estadísticamente significativa ($F=10.86$, $p<0.01$).

Se encontró un efecto de la variable “grupo” a lo largo de la totalidad del experimento, hallando diferencias estadísticamente significativas ($F<19.56$; $p<0.05$) en el consumo de solución entre el grupo 8% y el resto de grupos.

También se encontraron diferencias significativas en el consumo de solución de H_2O ($F<108.41$; $p<0.01$), 4% ($F<259.27$; $p<0.01$) y 8% ($F<86.14$; $p<0.05$) para cada uno de los días.

Para una representación gráfica de los resultados ver Figura 1.

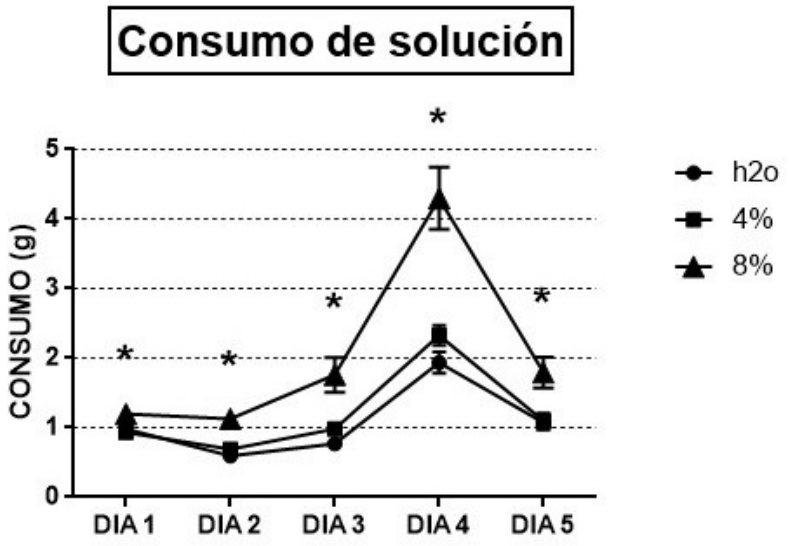


Figura 1. Medias de la solución consumida para los distintos grupos objeto de estudio durante el experimento. Se indica con (*) diferencias significativas con un valor $p<0.05$ para la variable "grupo".

Discusión

Bajo los resultados anteriormente expuestos se comprueba que al 4º día de procedimiento se produce un notable aumento en el consumo (especialmente de la solución de etanol al 8%) produciéndose el efecto "DID" (entendido como un incremento significativo del consumo el cuarto día de presentación de las soluciones), lo que indica que los ratones de la cepa CD-1 responden al paradigma pese a ser una cepa típicamente catalogada como de bajo consumo.

Además, podemos concluir que el modelo DID para la cepa CD-1, en soluciones de etanol al 8% en agua, puede ser usado para estudios farmacológicos y como modelo de consumo voluntario de alcohol, actuando como un modelo traslacional para el estudio de causas, consecuencias y tratamientos para el alcoholismo.

Soluciones de etanol inferiores al 8% parecen no responder de manera tan satisfactoria por lo que es necesaria la realización de nuevos estudios a concentraciones superiores para comprobar si la solución de etanol al 8% en agua es la óptima para este tipo de estudios.

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado en parte por el grupo CTS-109 de la Junta de Andalucía y los Laboratorios Esteve.

Bibliografía

1. World Health Organization. (2014). Global status reporton alcohol and health. WHO, Geneva.

2. Papini MR, Wood M, Daniel AN, Norris JN. (2006). Reward loss as psychological pain. Intern. Jour. Psych. Psychol. Ther. 6; 189-213.

3. Mustaca AE, Kamenetzky GV. (2006). Alcoholismo y ansiedad: modelos animales. Intern. Jour. Psych. Psychol. Ther. 6; 343-364.

4. Thiele Todd E, Navarro M. (2014). “Drinking in the Dark” (DID) Procedures: A Model of Binge-Like Ethanol Drinking in Non-Dependent Mice. Alcohol. 48; 235– 241.

5. Short JL, Drago J, Lawrence AJ. (2006). Comparison of ethanol preference and neurochemical measures of mesolimbic dopamine and adenosine systems across different strains of mice. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 30(4), 606-620.

Capítulo 16

Estudio mediante ERGmf de pacientes con sospecha de toxicidad retiniana por hidroxicloroquina

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

Resumen

Objetivo. Evaluar el estado de la retina de pacientes en tratamiento con hidroxicloroquina (HCQ) con sospecha de toxicidad retiniana mediante electrorretinograma multifocal (ERGmf).

Materiales y Métodos. Cincuenta y un pacientes tratados con HCQ por diversas enfermedades autoinmunes con sospecha de toxicidad retiniana fueron evaluados mediante ERGmf y los resultados se compararon con un grupo control. Se compararon también los datos de dosis diaria, dosis acumulada y años de tratamiento de los pacientes a los que tras el estudio se les retiró la HCQ por toxicidad retiniana y los del grupo a los que se les mantuvo el tratamiento.

Resultados. La densidad P1 total de las retinas del grupo de pacientes fue significativamente menor ($p<0.001$) que la densidad del grupo control. Por cada anillo, el porcentaje de pérdida fue desde un 43,69% menor en el anillo 1 hasta un 34,71% en el anillo 5, con respecto al control. A 10 de los 51 pacientes se indicó la retirada del fármaco por sospecha cierta de toxicidad. La dosis diaria de HCQ fue significativamente mayor ($p<0,05$) en el grupo de retirada respecto del grupo de mantenimiento.

Conclusiones. Los pacientes con sospecha de toxicidad retiniana por HCQ evaluados mediante ERGmf muestran un patrón central de pérdida de densidad P1 que indica una alteración macular. La dosis diaria es el factor de riesgo más determinante para el desarrollo de la toxicidad retiniana por HCQ.

Introducción

La hidroxicloroquina (HCQ) es un fármaco perteneciente al grupo de los antipalúdicos, ampliamente utilizado para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes sistémicas tales como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjogren y conectivopatías indiferenciadas entre otras (1).

El uso prolongado de la HCQ como tratamiento de las enfermedades autoinmunes sistémicas puede provocar en el paciente una toxicidad retiniana cuya lesión cursa con una pérdida permanente de visión (2). Dicha lesión 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' (3).

La toxicidad retiniana por HCQ tiene una baja prevalencia de un 0,38% (4) de pacientes que toman dicho fármaco. Esta prevalencia puede incrementarse después de 5 a 7 años de tratamiento a un 1% (5). Sin embargo, estudios recientes indican que la prevalencia puede variar de forma notable según la dosis diaria de HCQ y la duración de su uso (6). Así, los pacientes con una dosis diaria ≤ 5.0 mg/kg tienen menos de 1% de riesgo en los primeros 5 años de terapia y menos del 2% a los 10 años. El riesgo aumenta bruscamente a partir de los 20 años hasta un 20% (6).

Recientemente, la American Academy of Ophtahalmology distingue entre los factores de riesgo que aumentan la probabilidad de desarrollar una toxicidad en los pacientes que toman HCQ, la dosis diaria y acumulada, la duración del tratamiento, la existencia de patologías renales, de enfermedades maculares y le uso de drogas concomitantes (tamoxifen) (7).

El reconocimiento temprano del efecto toxico de la HCQ, antes de que aparezca una alteración visible en el fondo de ojo, minimiza en gran medida su progresión y el riesgo de pérdida visual (8). 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 electrorretinografía multifocal (ERGmf) 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 pueden encontrar en un test de agudeza visual y puede detectar cambios funcionales tempranos en la retina (9). Estos cambios funcionales preceden a los estructurales como los observados en la tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (10). En estudios comparativos, la ERGmf ha demostrado tener mayor sensibilidad que la perimetría 10-2 o la tomografía de coherencia óptica en la detección de la toxicidad (11).
El objetivo del presente estudio ha sido evaluar el estado de la retina de pacientes en tratamiento con HCQ con sospecha de toxicidad retiniana mediante ERGmf.

Materiales y Métodos

En el presente estudio han participado 51 pacientes (edad media de 48 años, 47 mujeres). Todos han sido diagnosticados por enfermedades autoinmunes sistémicas por médicos especialistas y han estado en tratamiento con HCQ. La dosis diaria del conjunto de los pacientes es 211 mg de media, la dosis acumulada es de 439 g, y los años de tratamiento de 6. El grupo control está formado por 11 pacientes, no relacionados con la patología de estudio, con una edad media de 45 años y de los que se han seleccionado 17 retinas sanas.

Todos los pacientes participantes en el estudio han sido atendidos en el Servicio de Neurofisiología Clínica del Hospital Universitario San Cecilio de Granada (HUSC). Todos los pacientes dieron su consentimiento para la realización del presente trabajo. La evaluación de la retina mediante electrorretinografía multifocal (Diagnosys LLC, Lowell MA, USA) fue realizada en el Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva de la Universidad de Granada, siguiendo las recomendaciones de la International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Cada ERGmf consistió en la obtención de 61 registros, que para su análisis se agruparon en 5 anillos concéntricos. De los registros de la 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

De los 101 ojos de pacientes estudiados, 95 mostraron valores por debajo del límite inferior de confianza de la densidad suma del registro de la ERGmf obtenido del grupo control (Figura 1). La densidad P1 total expresada en $\mu V/deg^2$ de las retinas del grupo de pacientes fue significativamente menor ($p<0.001$) que la densidad del grupo control (Figura 2). Por cada anillo, el porcentaje de pérdida tuvo un rango desde un 44% menor en el anillo 1 hasta un 35% en el anillo 5 con respecto al control.

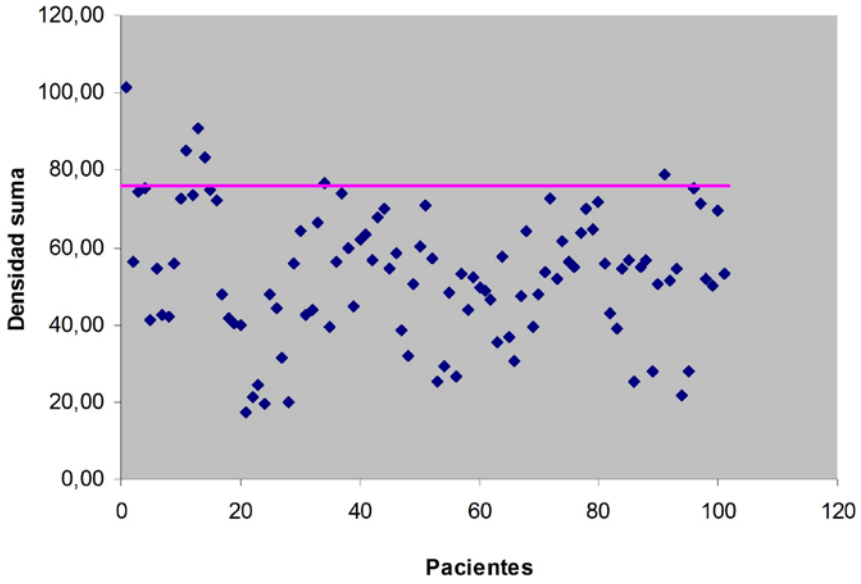


Fig 1. Cada punto representa la densidad total de cada retina. La densidad total consiste en la suma de la densidad eléctrica P1 de los 5 anillos del ERGmf. La línea representa el límite inferior del intervalo de confianza de la densidad total del grupo control.

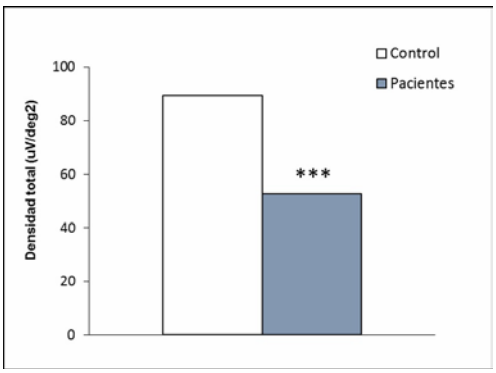


Fig 2. Densidad eléctrica total del grupo de pacientes comparado con el grupo control. *** P<0.001.

De los 51 pacientes estudiados a 10 de ellos se indicó la retirada de la HCQ por sospecha de toxicidad retiniana tras las alteraciones observadas en el ERGmf, que mostraron disminuciones de la densidad de la onda P1 localizadas en áreas paramaculares y centrales. En su conjunto, la pérdida de densidad con respecto al grupo control muestró un patrón central. El estudio estadístico para comparar la pérdida de densidad por cada anillo de ambos grupos muestró diferencias significativas (p<0,05) únicamente en el anillo 5, y unos resultados cercanos a la significación en el anillo 4 (Figura 3). Los pacientes a los que se les indicó continuar con el tratamiento mostraron un patrón central menos acentuado.

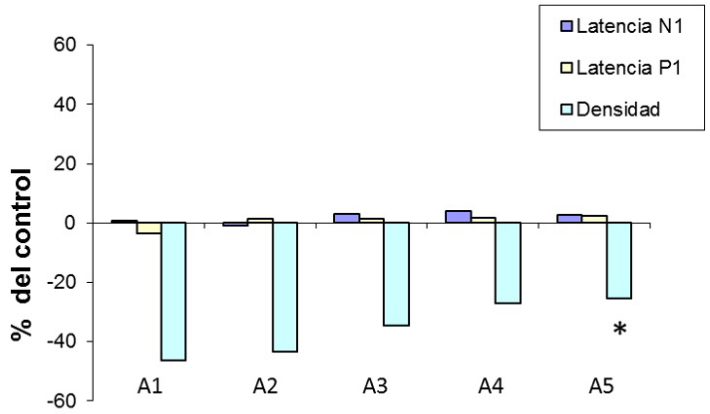


Fig 3. Porcentaje de pérdida de densidad eléctrica P1 y latencias N1-P1 del grupo de retirada de HCQ, expresado en porcentaje por cada anillo. * p<0.05.

Respecto a las latencias de las ondas N1 y P1, no se observaron diferencias significativas ni entre el grupo de pacientes y el grupo control, ni entre los dos grupos experimentales de retirada y mantenimiento del tratamiento con HCQ.

En relación a los factores de riesgo, el grupo de mantenimiento con HCQ tiene mayor número de años de tratamiento que el grupo de retirada de HCQ (6,2 ± vs 4,5 años). Por otro lado, el grupo de retirada de HCQ tiene más dosis acumulada (448 vs 437 g) y más dosis diaria (261vs 199 mg). Estas diferencias sólo fueron estadísticamente significativas (p<0,05) en el caso de la dosis diaria (Figura 4). No se encontraron diferencias significativas en la edad de ambos grupos.

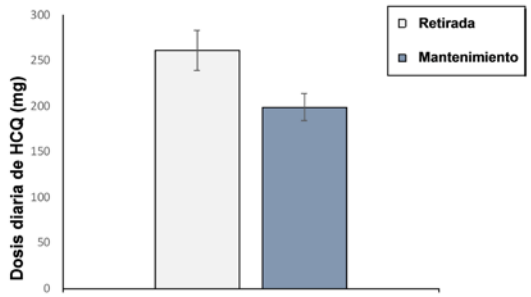


Fig 4. Dosis diaria de HCQ de ambos grupos experimentales. * P<0.05.

Discusión

La American Academy of Ophthamology, en su última revisión de 2016, recomienda para el despistaje de retinopatía por HCQ la realización una ERGmf (7). La ERGmf ha demostrado tener una sensibilidad para detectar toxicidad temprana por HCQ similar o mayor que la perimetría 10-2 y otorga una confirmación objetiva de las alteraciones en los campos visuales (11, 12). En nuestro estudio, el 94% de las retinas de los pacientes que acudieron por sospecha de toxicidad muestraron valores por debajo del límite de confianza del grupo control. Solo una pequeña parte se encuentró dentro de la normalidad. La gran mayoría muestró una disminución de la densidad eléctrica P1 en torno al 40% en todos los anillos con una tendencia de afectación central. Algunos estudios apuntan a que la disminución de la densidad eléctrica en pacientes en tratamiento con HCQ puede deberse a un efecto secundario farmacológico, que no puede considerarse propiamente como toxicidad pero que altera los valores del ERGmf (13). Sin embargo, estas alteraciones preferentemente en los anillos centrales 1 y 2, que corresponden a la región macular, y a su vez en todos los anillos del registro, sustentan las sospechas de la presencia de una toxicidad temprana por HCQ (14, 15). Esto dificulta el despistaje entre el efecto farmacológico y la toxicidad, así como de la propia enfermedad de base cuyo agravamiento puede afectar a la retina.

En el presente estudio, en 10 de los 51 pacientes se determinó la retirada del fármaco por sospecha cierta de toxicidad temprana por HCQ a la vista de los resultados en el ERGmf. En el análisis por anillos, no se encuentró un patrón de afectación parafoveolar (anillo 2) característico de la toxicidad por HCQ (6), pero sí un patrón de afectación central (predominio de afectación en el anillo 1) con afectación parafoveolar más acentuado que en el grupo que continuó con el tratamiento, que tiende a un patrón generalizado. Ésto puede demostrar que estos pacientes con sospecha cierta de toxicidad tienen ya una afectación macular que supera a la afectación parafoveolar, y que no se trata pues de casos de toxicidad por HCQ en su fase más inicial (afectación localizada en el anillo 2), si no en fases más avanzadas y previas al daño del epitelio pigmentario de la retina visible con fundoscopia. Gran parte de los objetivos de la retirada del fármaco están

encaminados a la preservación macular que es susceptible de una recuperación tanto en la mácula como en el resto de la retina central (8, 16).

Ninguna terapia ha probado que sea efectiva para prevenir, tratar o reducir el riesgo de retinopatía por HCQ, salvo el cese de la administración de la misma. Incluso la retirada de la HCQ no previene la progresión de la retinopatía por sus efectos acumulativos. Es importante pues el seguimiento mediante ERGmf para confirmar en su caso la sospecha de toxicidad y la recuperación de la retinopatía tal y como demuestran estudios previos (17). Además, estudios recientes proponen que las alteraciones en la premaculopatía por HCQ pueden ser revertidas no sólo con la retirada del fármaco sino también con la reducción de dosis y el ERGmf sería útil para el seguimiento de la terapia con HCQ (18).

A diferencia de los resultados obtenidos con la densidad eléctrica de las respuestas del ERGmf, las diferencias entre ambos grupos y el grupo control en las latencias N1 y P1 no fueron significativas en ningún anillo. Esto, está de acuerdo con datos previos (13, 17) 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 el grupo con retirada del fármaco ninguno de los 10 pacientes superó la dosis diaria de 400mg/día y únicamente un paciente superó los 1000 mg de dosis acumulada. En cuatro de estos 10 pacientes se superaron los 5 años de tratamiento y en uno de ellos los 10 años. En el grupo con mantenimiento de HCQ ningún paciente superó la dosis de 400 mg/día, y en 2 casos se superó la dosis acumulada de 1000 g. En 23 casos se superaron los 5 años de tratamiento y en 8 casos se superaron los 10 años. El primer grupo superó al segundo en cuanto a dosis acumulada, y quedó por debajo en el tiempo de tratamiento. Sin embargo, no se encontró significación estadística en estas diferencias. Las edades también fueron parecidas en ambos grupos.

Únicamente se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p<0,5$) en cuanto a la dosis diaria, que es según la literatura el factor de riesgo más crítico para el desarrollo de la toxicidad la dosis de HCQ en relación al peso del paciente (6). Una dosis > 5 mg/kg incrementa de forma importante el riesgo en la población e incrementa el riesgo anual. Estudios recientes en paciente con dosis de HCQ elevadas de 800 a 1000 mg/día (superior a 20 mg/kg) como tratamiento para

enfermedades no sistémicas mostró un 25%-40% de incidencia de retinopatía y signos de daño en 1-2 años.

En su evaluación del impacto de las recomendaciones de la American Academy of Ophthamology en el screening de la retinopatía por HCQ, Browning y colaboradores sugieren que la dosis diaria segura de HCQ podría ser obtenida a través de un estudio longitudinal de los pacientes con exámenes seriados con ERGmf (11).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran en primer lugar que los pacientes con sospecha de toxicidad retiniana por HCQ evaluados mediante ERGmf tienen un patrón central de pérdida de densidad P1 que indica una alteración macular. En segundo lugar que la dosis diaria es el factor de riesgo más determinante para el desarrollo de la toxicidad retiniana por HCQ.

Bibliografía

1. Yam JCS, Kwok AKH. Ocular toxicity of hydroxychloroquine. (2006). Hong Kong Med J. 12, 294-304.

2. Raines MF, Bhargava SK, Rosen ES. (1980). The blood-retinal barrier in chloroquine retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 30,1726-1731.

3. Elder M, Rahman AMA, McLay J. (2006). Early paracentral visual field loss in patients taking hydroxychloroquine. Arch Ophthalmol. 124, 1729-1733.

4. Mavrikakis I, Sfikakis PP, Mavrikakis E, et al. (2004). The incidence of irreversible retinal toxicity in patients treated with hydroxychloroquine: a reappraisal. Ophthalmology. 110, 1321-1326.

5. Wolfe F, Marmor MF. (2010). Rates and predictors of hydroxychloroquine retinal toxicity in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Care Res (Hoboken). 62, 775-784.

6. Melles RB, Marmor MF. (2014). The risk of toxic retinopathy in patients on long-term hydroxychloroquine therapy. JAMA Ophthalmol. 132, 1453-1460.

7. Marmor MF, Kellner U, Lai TY, Melles RB, Mieler WF. (2016). American Academy of Ophthalmology Recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy (2016 Revision). Ophthalmology. 123(6), 1386-1394.

8. Marmor MF, Hu J. (2014). Effect of Disease Stage on Progression of Hydroxychloroquine Retinopathy. JAMA Ophthalmol. 132, 1105-1112.

9. Tsang AC, Ahmadi Pirshahid S, Virgili G, Gottlieb CC, Hamilton J, Coupland SG. (2015). Hydroxychloro-quine and chloroquine retinopathy: a systematic review evaluating the multifocal electroretinogram as a screening test. Ophthalmology. 122, 1239-1251.

10. 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(1), 13-23.

11. Browning DJ, Lee C. (2014). Relative sensitivity an 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.

12. Lai TY, Ngai JW, Chan WM, Lam DS. (2006). Visual field and multifocal electroretinography and their correlations in patients on hydroxychloroquine therapy. Doc Ophthalmol. 112, 177-187.

13. 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.

14. Marmor MF. (2012). Comparison of screening procedures in hydroxychloroquine toxicity. Arch Ophthalmol. 130,461-469.

15. 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.

16. Rodríguez-Hurtado FJ, Sáez-Moreno JA, Rodríguez-Ferrer JM. (2015). Toxicidad ocular y recuperación visual funcional en una paciente tratada con hidroxicloroquina. Reumatol Clin. 11, 170-173.

17. Moschos MN, Eirini Nitoda, Irini P Chatziralli, Zisis Gatzioufas, Chryssanthi Koutsandrea, George Kitsos. (2015). Assessment of hydroxychloroquine maculopathy after cessation of treatment: an optical coherence tomography and multifocal electroretinography study. Drug Des Devel Ther. 9, 2993–2999.

18. Sáez Moreno JA, Domínguez-Hidalgo C, Rodríguez-Ferrer JM. (2015). Multifocal ERG guiding therapy in a case of hydroxychloroquine premaculopathy. Case Rep Ophthalmol Med. ID 656928, DOI:10.1155/2015/656928.

Capítulo 17

La atención como mecanismo cerebral compensador del deterioro de la percepción visual en el envejecimiento

Rodríguez-Aguilera JM, Rodríguez-Ferrer JM

Resumen

Objetivo. Estudiar el deterioro de la percepción visual con la edad y los efectos compensadores de la atención visual.

Materiales y Métodos. En tres grupos de 30 personas con visión normal y con edad media de 20, 43y 66 años, se midieron los tiempos de respuesta a estímulos (un círculo gris de 0.5 grados de diámetro) presentados de forma secuencial en 24 posiciones del campo visual, distribuidas en 8 coordenadas polares (0, 45, 90, 135, 180, 225, 270 y 315 grados de una circunferencia) y 3 excentricidades (2.15, 3.83 y 5.53 grados de campo visual). El estímulo se presentó durante 100 milisegundos, con bajo, medio y alto contraste (6, 16 y 78%, respectivamente) y se midieron los tiempos de respuesta. En los contrastes de 6 y 78%, los experimentos con estímulos de bajo contraste (6%) se realizaron también con atención encubierta a los estímulos.

Resultados. Todos los participantes mostraron aumentos de los tiempos de respuesta conforme disminuyó el contrate y aumentó la excentricidad. Este patrón de respuesta se observó en los tres grupos de edad. Los tiempos de respuesta a todos los estímulos presentados aumentaron con la edad.Cuando los experimentos se realizaron atendiendo de manera encubierta a los estímulos, los tiempos de respuesta se redujeron significativamente en los tres grupos de edad. El grupo de mayores mostró reducciones superiores al de adultos y similares al de jóvenes.

Conclusiones. Los resultados muestran, en primer lugar, que durante el envejecimiento se produce un deterioro progresivo en la percepción de estímulos, especialmente en los de bajo contraste. Por otra parte, durante el envejecimientose potencia el desarrollo de mecanismos compensadores de atención visual.

Introducción

El sistema visual, como otros componentes del sistema nervioso, se deteriora con el envejecimiento. Durante el envejecimiento normal, se estima que el número de conos y bastones de la retina disminuye en un 1.8 % y un 3 % por década, respectivamente, mientras que las células ganglionares lo hacen en un porcentaje del 0.5 % (1, 2). En la corteza visual el número de sinapsis decrece progresivamente desde el primer año de vida, llegando a una disminución del 50% a los 70 años de edad (3). En primates, el envejecimiento produce alteraciones funcionales la corteza visual primaria como una menor selectividad al contraste y resolución espacial (4, 5), así como una disminución de la selectividad direccional de las neuronas visuales encargadas del procesamiento cortical del movimiento (6). La disminución de los bastones y de las células ganglionares retinianas, junto con las alteraciones funcionales de la corteza visual durante el envejecimiento, son responsables de la disminución de la sensibilidad al contraste y del aumentodel umbral de detección de luz que, en condiciones de baja iluminación, presentan las personas mayores (7, 8). Esto se corresponde con la queja habitual de las personas mayores de que tienen dificultad de ver, leer o conducir en ambientes poco iluminados o de noche. Este deterioro de la función visual, se asocia con una mayor propensión de los ancianos a tener caídas y accidentes de tráfico en condiciones de iluminación reducida (9).

En un estudio previo, hemos mostrado que en la retina central humana los tiempos de respuesta obtenidos ante la presentación de estímulos dependen tanto del contraste como de la excentricidad (10). Así, se alcanzan tiempos de respuesta mayores con estímulos de menor contraste (6%) y mayor excentricidad (5.53 grados de campo visual). Además, para esta excentricidad se observa un aumento gradual de los tiempos de respuesta conforme disminuye el contraste.

El objetivo del presente estudio ha sido investigar cómo la edad influye en la percepción de estímulos que varía en contraste y excentricidad en el campo visual. Así como evaluar los efectos de la atención sobre la percepción visual en sujetos jóvenes y mayores.

Materiales y Métodos

El estudio se ha llevado a cabo en 3 grupos de voluntarios sanos. Un primer grupo de30 jóvenes (15 hombres, con edad media de 20 años). Un segundo grupo de30 adultos (15 hombres, con edad media de43 años) y finalmenteuntercer grupo de 30 mayores (15 hombres, con edad media de66 años). Todos teníanuna agudeza visual normaly dieron su conformidad por escrito para participar en los experimentos.

Los experimentos se realizaron en una habitación con luz artificial atenuada. Los participantes se sentaron a una distancia de 114.5 cm frente a un monitor de rayos catódicos de 24x32 cm, esto subtiende un ángulo visual de 11.84x15.61º. Sobre un fondo gris, con luminancia de 28.87 Cd/m2, se presentó en el centro de la pantalla una cruz roja de 0.5º grados de tamaño. El monitor se desplazó verticalmente hasta situar la cruz a la altura de los ojos de cada participante.

Se realizaron dos pruebas. En la primera, se estudió la detección de estímulos visuales que variaron en su contraste y localización en el campo visual. En esta prueba los participantes, manteniendo la mirada fija en la cruz situada en el centro del monitor, debían responderapretando el botón de un mando lo más rápido posible ala presentación de los estímulos (un circulo gris de 0.5º, grados de diámetro) que sepresentaron de forma secuencialen 24 posiciones alrededor de la cruz central, distribuidas en8 coordenadas polares(0, 45, 90, 135, 180, 225, 270 y 315º, grados de una circunferencia, en la que los 0 grados se corresponden con la posición de las 12h en el relojy 3excentricidades (2.15, 3.83 y 5.53º, grados de ángulo visual). En cada posición, el estímulo se presentó durante 100 ms, con3 niveles de contraste(6, 16 y 78%) sobre el fondo de la pantalla.

Seguidamente, en una segunda prueba se estudiaron los efectos de la atención encubierta en la detección de los estímulos de contrate del 6%.En este caso, antes de la presentación de losmismos se mostró durante 100 ms una flecha indicando la coordenadaen la que iban a aparecer los estímulosy hacia la cual los participantes debían dirigir su atención de manera encubierta mientrasmantenían su mirada en la cruz central. Terminada la presentación de estímulos en una coordenada, otra flecha indicaba una nueva coordenada.

En todos los experimentos, el orden de presentación de los estímulos y el tiempo interestímulos (entre 500 y 3000 ms) fue determinado al azar mediante la

aplicación informática EEVOKE en su versión 2 (ANT software BV. Enschede, Países Bajos). Los tiempos de respuesta se registraron mediante el programa ASA en su versión 3 (Advance Source Analysis, ANT software BV). El Análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el paquete de programas estadísticos SPSS, versión 15.0.

Resultados

En la figura 1 se muestran las coordenadas polares, las excentricidades y los contrastes de los estímulos utilizados. En la figura 2 se muestran los efectos del contraste y de la excentricidad, independientemente de las coordenadas polares, en todos los sujetos experimentales. En ella se observa que los tiempos de respuesta con estímulos del 16 y 78% de contraste son similares en las tres excentricidades analizadas. Por el contrario, para el contraste del 6% los tiempos de respuesta aumentaron en las tres excentricidades y fueron significativamente mayores (p<0.001) en comparación con los obtenidos en el contraste mayor (78%).

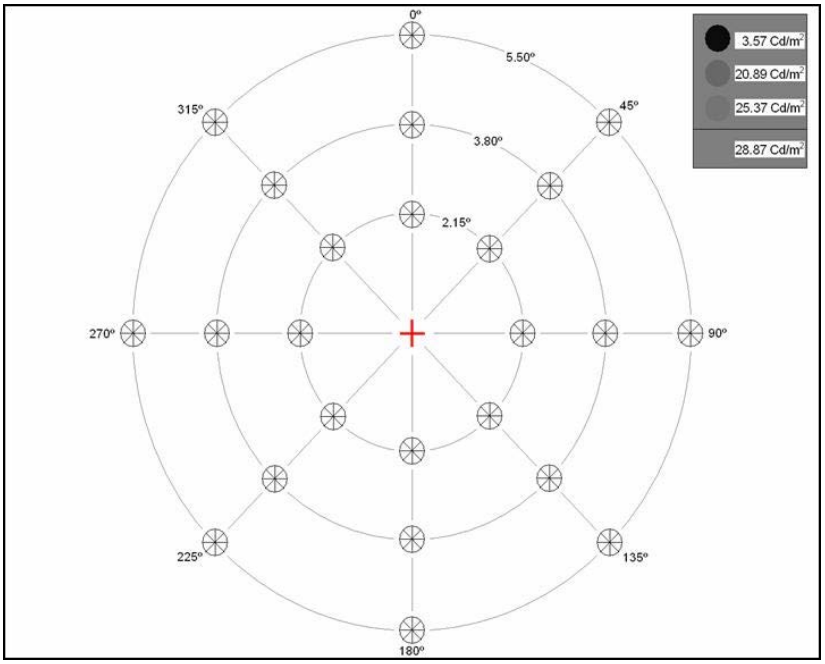


Fig 1. Diagrama que muestra el punto de fijación de la mirada (cruz central) y las 24 posiciones donde los estímulos se presentaron con tres niveles de contraste. En la parte superior derecha se indican los tres valores de luminancia de los estímulos y el del fondo de pantalla utilizados.

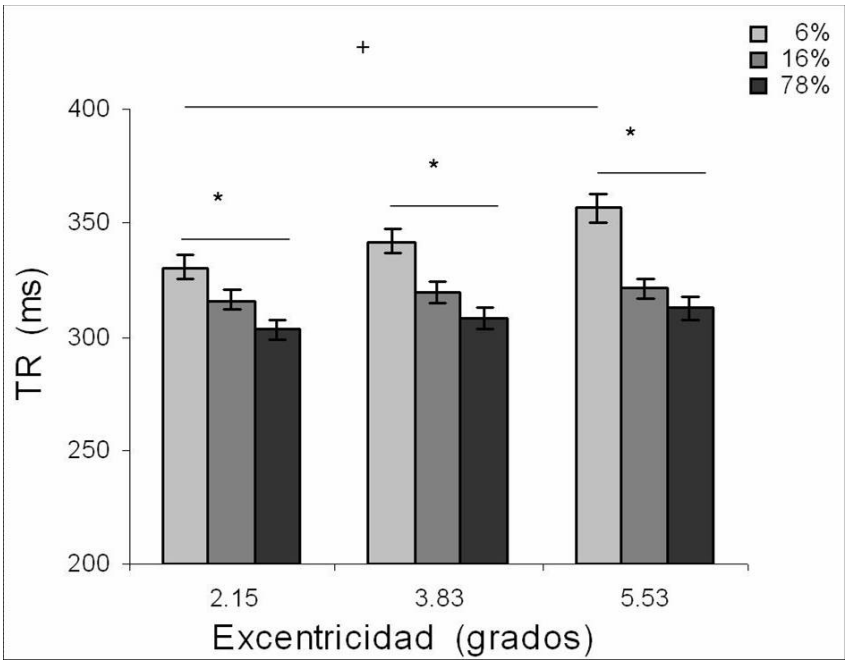


Fig 2. Cada barra representa la media (± SEM) de los tiempos de respuesta (TR) obtenidos en los 90 participantes. *P< 0.001 *vs* 78% de contraste. +P< 0.001 *vs* 6% de contraste en la excentricidad de 5.53 grados.

En la figura 3 se muestran los efectos del contraste y de la excentricidad, independientemente de las coordenadas polares, en los tres grupos de edad. Puede observarse como los tiempos de respuesta se incrementan conforme aumenta la edad. Elincremento de los tiempos de respuesta es especialmente intenso en el grupo de mayores para el menor contraste utilizado (6%), siendo significativo (p<0.001) en las excentricidades de 2.15 y 5.53 grados, en comparación con el grupo de jóvenes.

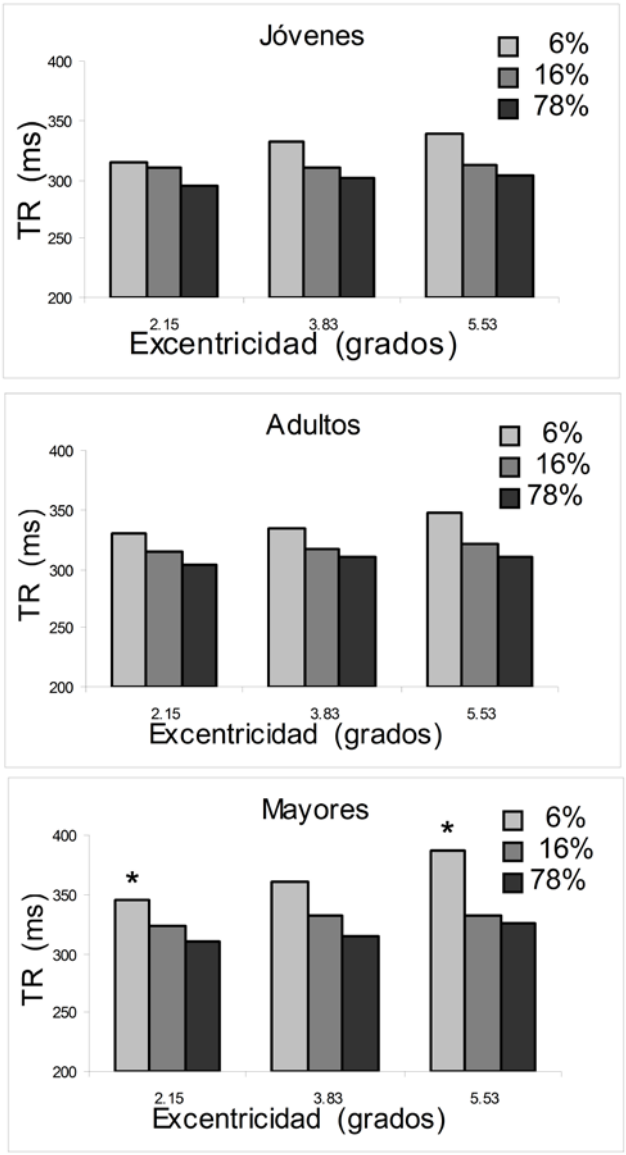


Fig 3. Cada barra representa la media de los tiempos de respuesta (TR) obtenidos en los grupos de jóvenes, adultos y mayores. Obsérvese cómo los TR aumentan con la edad de los grupos.*P< 0.001 *vs* grupo de jóvenes

En la prueba de atención encubierta, los tiempos de respuestade los estímulos de bajo contraste (6%) fueron, en los tres grupos de edad, inferiores a los obtenidos en la prueba realizada previamente sin atención y cuyos datos se han utilizado como control. Este descenso se situó entre el 2% y el 12% (Figura 4). En la excentricidad menor de 2.15º, el descenso de los tiempos de respuesta fue significativo (p<0.05) sólo en el grupo de jóvenes, mientras que en las otras dos excentricidades el descenso fue significativo (p<0.001) en los tres grupos de edad. En esta figura, se observa también que el grupo de adultos tiene el porcentaje de disminución en los tiempos de respuesta más bajo en las tres excentricidades

estudiadas, mientras que los valores obtenidos por el grupo de mayores es similar al de los jóvenes.

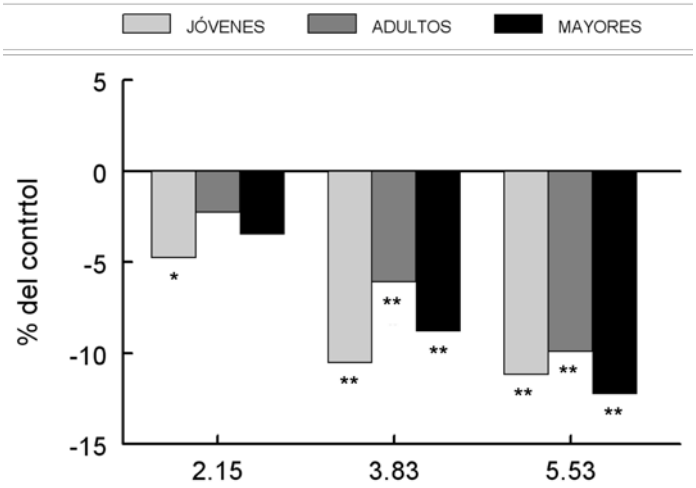


Fig 4. Efectos de la atención encubierta en los tres grupos de edad. Se muestra la disminución de los TR respecto del control. Cada barra representa la media de los valores obtenidos. * $p<0.05$, ** $p<0.001$.

Discusión y Conclusiones

Los estímulos utilizados se han presentado en los diez grados centrales de la retina y que corresponden a la mácula. Los resultados muestran que, en la retina central humana, los tiempos de respuesta obtenidos ante la presentación de estímulos dependen tanto del contraste como de la excentricidad. Así, se obtienentiempos de respuesta mayores con estímulos de menor contraste (6%) y mayor excentricidad (5.53º). Esto da lugar a un patrón característico en la percepción visual que consiste en que los tiempos de respuesta aumentan conforme disminuye el contraste de los estímulos y aumenta su excentricidad. Este patrón se observa en los tres grupos de edad, por lo que no se ve afectado por el envejecimiento.Esto concuerda con la evidencia de que la actividad de las neuronas de la corteza visual depende críticamente del nivel de contraste de los estímulos[11, 12]. Por otra parte, conforme nos alejamos del centro de la retina o fóvea, la agudeza visual disminuye. Esto se debe, en parte, al descenso de la densidad de conos, de células ganglionares y del factor de magnificación cortical, así como al aumento del tamaño de los campos receptores (13).

Cuando se comparan los distintos grupos de edad se observa que la percepción visual se deteriora con el envejecimientoy que este deterioro es selectivo. Así, los estímulos que presentan condiciones más adversas para su percepción, como son los estímulos de bajo contraste (6%) y presentados en las zonas periféricas de

mácula (5.53º), son los que más aumentan su tiempo de respuesta con la edad. Sabemos que tanto los fotorreceptores como las células ganglionares de la retina disminuyen en número de manera progresiva con la edad, aunque en distinto grado. Así mientras que los bastones, responsables de la visión nocturna o escotópica, decrecen a un ritmo de 3% por década, los conos, responsables de la visión diurna o fotópica, disminuyen en un 1.8% y las células ganglionares retinianas en un 0.5% (1). Los experimentos se han realizado en condiciones fotópicas, por lo que el deterioro visual observado podría estar relacionado con la pérdida de conos que ocurre con el progreso de la vida. Por otra parte, estos efectos pueden también deberse a que la edad induce en lasneuronas visuales corticales donde el envejecimiento un deterioro tanto funcional (4, 5) como en la actividad sináptica de las conexiones que establecen (3).

La atención encubierta consiste en la focalización de la atención visual sobre los estímulos que se presentan en las zonas periféricas del campo visual. Diversos estudios muestran que la atención encubierta favorece la percepción visual (14, 15). Esto se debe a que los procesos de atención cerebrales aumentan la actividad de la corteza visual debido a la activación de proyecciones eferentes procedentes de las áreas extraestriadas dorsales y ventrales a la corteza visual primaria (16). Esta activación neuronal es mayor con los estímulos de bajo contraste [11]. De acuerdo con estas evidencias, los resultados muestran que la atención a los estímulos de bajo contraste presentados en las distintas excentricidades produce un descenso significativo de los tiempos de respuesta respecto de la prueba controlen los tres grupos de edad.

A diferencia de los experimentos realizados sin atención,dondelos tiempos de respuestase incrementan con la edad, los resultados muestran que el grupo de adultos es el que menor beneficio obtiene cuando atienden de manera encubierta a los estímulos. En cambio, tanto jóvenes y mayores muestran importantes reducciones de los tiempos de respuestabajo condiciones de atención.

El deterioro visual en las personas mayores, especialmente su dificultad en la percepción de estímulos de bajo contraste, como demuestran los presentes resultados, y la dificultad en la percepción del movimiento y en la integración de sus diversos componentes (17) puede explicar la propensión de este grupo de edad a tener caídas y accidentes de tráfico en condiciones de iluminación reducida

(9). No es de extrañar pues que se desarrollen estrategias cerebrales específicas que tiendan a compensar estos déficits asociados a la edad. En este sentido, la atención encubierta puede ser una herramienta útil para los mayores, ya que al mejorar la percepción en zonas periféricas del campo visual permite una reacción adecuada, a pesar de tener una peor integración sensorio-motora que durante la juventud o la edad adulta. Los estudios sobre deterioro cognitivo y edad sitúan en los 60 años el inicio de un declive general y significativo de las capacidades cognitivas en humanos (18, 19). Esto puede no ser estrictamente aplicable a todas las funciones cognitivas, como muestranlos resultados sobre atención visual mostrados en el presente trabajo. En este sentido existen crecientes evidencias de que el ritmo del envejecimiento no es algo que esté inevitablemente fijado, sino que es un proceso abierto a modificaciones que incluyen procesos de plasticidad neuronal (20). En este sentido, no todas las funciones cognitivas tienen que seguir necesariamente la misma evolución a lo largo de la vida.

Los presentes resultados muestran en primer lugar que durante el envejecimiento se produce un deterioro selectivo y progresivo en la percepción de estímulos de bajo contraste y que este deterioro es mayor en las zonas maculares periféricas. En segundo lugar, los resultados evidencian que ante los hándicaps visuales provocados por el envejecimiento, se potencia con la edad el desarrollo de mecanismos compensadores de atención,que mejoran la percepción visual en situaciones donde la atención es requerida.

Bibliografía

1. Owsley C. (2011). Aging and vision. Vision Research, 51 (13), 1610-1622.
2. Blanks JC, Dorey CK. (2009). Sensory Aging: Vision. In: Hof PR, Mobbs V (eds) Handbook of the Neuroscience of Aging. Academic Press, London, pp. 641-655.
3. Huttenlocher PR. (2002). Neural plasticity: The effects of environment on the development of the cerebral cortex. Harvard University Press, Cambridge.
4. Yang Y, Liang Z, Li G, Wang Y, Zhou Y, Leventhal AG. (2008). Aging affects contrast response functions and adaptation of middle temporal visual area neurons in rhesus monkeys. Neuroscience. 156(3), 748-757.
5. Zhang J, Wang X, Wang Y, Fu Y, Liang Z, Ma Y, Leventhal AG. (2008). Spatial and temporal sensitivity degradation of primary visual cortical cells in senescent rhesus monkeys. European Journal of Neuroscience. 28(1), 201-207.

6. Wang Y, Zhou Y, Ma Y, Leventhal AG. (2005). Degradation of signal timing in cortical areas V1 and V2 in senescent monkeys. Cerebral Cortex. 15(4), 403-408.

7. Dimitrov PN, Robman LD, Varsamidis M, et al. (2011). Visual function tests as potential biomarkers in age-related macular degeneration. Investigative Ophthalmology and Visual Sciences. 52(13), 9457-9469.

8. Guillespie-Gallery H, Konstantakopoulou E, Harlow JA, Barbur JL. (2013) Capturing age-related Changes in functional contrast sensitivity with decreasing light levels in monocular and binocular vision. Investigative Ophthalmology and Visual Sciences. 54(9), 6093-6113.

9. Källstrand-Ericson J, Hidingh C. (2009). Visual impairment and falls: A registerstudy. Journal of Clinical Nursing. 18, 366-372.

10. Mancebo R, Sáez JA, Domínguez I, Luna JD, Rodríguez-Ferrer JM. (2009). Efectos del contraste, excentricidad y posición en la detección de estímulos visuales en humanos. Revista de Neurología. 48(3), 129-133.

11. Reynolds JH, Pasternak T, Desimone R. (2000). Attention increases sensitivity of V4 neurons. Neuron. 26,703-714.

12. Williford T, Maunsell JHR. (2006). Effects of attention on contrast response functions in macaque area V4. J Neurophisiol. 96, 40-54.

13. Rovamo J, Makela P, Whitaker D. (1993). Models of the visual cortex on basis of psychophysical observations. In: Gulyas B (ed) Functional organization of the human visual cortex. Pergamon, Oxford, pp 241-254.

14. Ling S, Carrasco M. (2006). Sustained and transient covert attention enhance the signal via different contrast response functions. Vision Research, 46(8), 1210-1220.

15. Liquiang H, Dobkins KR.(2005). Attentional effects on contrast discrimination in humans: evidence for both contrast gain and response gain. Vision Research.45(9), 1201-1212.

16. Noesselt T, Hillyard SA, Woldorff MG, Schoenfeld A, Hagner T, HinrichsH,HeinzeH. (2002). Delayed striate cortical activation during spatial attention. Neuron. 35(4), 575-587.

17. Pilz KS, Bennett PJ, Sekuler AB. (2010). Effects of aging on biological motion discrimination. VisionResearch. 50(2), 211-219.

18. Stuart-Hamilton IA. (2007). Envejecimiento cognitivo normal. En: Tallis RC (ed) Geriatría. Marban, Madrid, pp. 125-142.

19. Rapp PR, Bachevalier J. (2008). Cognitive development and Aging. In: Squire LR(eds)Fundamental neuroscience. Academic Press,London,pp. 1039-1066.

20. Bishop NA, Lu T, Yankner BA. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. Nature. 464(7288), 529-535.

ENCUENTROS EN NEUROCIENCIAS
vol. V

Encuentros en Neurociencias Vol. V recoge las últimas investigaciones expuestas dentro de las VII Jornadas de Jóvenes Investigadores celebradas en el Parque de las Ciencias de Granada.

Estas Jornadas organizadas por el Instituto de Neurociencias "Federico Olóriz" de la Universidad de Granada, se enmarcan dentro de las actividades organizadas en la Semana Mundial del Cerebro 2018 y tienen como principal objetivo dar a conocer los diferentes aspectos de las investigaciones llevadas a cabo por los jóvenes investigadores en el área de las neurociencias.

UNIVERSITAS GRANATENSIS
PLUS ULTRA
1531

INSTITUTO
Neurociencias
GRANADA